

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin
Zentrum für Innere Medizin der Universitätsmedizin Rostock

komm. Direktor: Prof. Dr. med. C. Junghanß

Entwicklung des Chimärismus der Langerhans-Zellen nach
nicht-myeloablativer hämatopoetischer Knochenmarktransplantation
im Hundemodell

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Sabrina Peters
aus Berlin

Rostock, 2013

Datum der Abgabe: 30.09.2013

Datum der Verteidigung: 17.06.2014

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger
Universitätsmedizin Rostock

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Junghanß
Klinik III - Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin
Zentrum für Innere Medizin
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfgang Bethge
Klinik II - Hämatologie, Onkologie, Immunologie, Rheumatologie,
Pulmologie
Zentrum für Innere Medizin
Universitätsmedizin Tübingen

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Daniel Wolff
Klinik III - Hämatologie, Onkologie
Zentrum für Innere Medizin
Universitätsmedizin Regensburg

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	8
1.1. Stammzelltransplantation	8
1.2. Stammzelltransplantation mit reduzierter Konditionierung	9
1.3. Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (Graft-versus-Host-Disease)	11
1.4. Langerhans-Zellen	14
2. Aufgabenstellung	18
3. Material und Methoden	19
3.1. Material	19
3.1.1. Chemikalien	19
3.1.2. Reagenzien und Enzyme	19
3.1.3. Puffer und Lösungen	20
3.1.4. Antikörper und MicroBeads	21
3.1.5. Geräte	21
3.1.6. Verbrauchsmaterialien	22
3.1.7. Medikamente und medizinische Produkte	23
3.2. Methoden	24
3.2.1. Versuchstiere	24
3.2.2. Durchführung der Knochenmarktransplantation	24
3.2.3. Hautbiopsate	26
3.2.4. Präparation von Epidermiszellen	26
3.2.5. Isolierung der Langerhans-Zellen	28
3.2.6. Bestimmung der Zellzahl	29
3.2.7. Elektronenmikroskopie	30
3.2.8. Durchflusszytometrie	30
3.2.9. Isolierung der DNA aus angereicherten Langerhans-Zellen	32
3.2.10. LZ-DNA-Replikation mittels PCR	32
3.2.11. Isolierung der PBMZ und Granulozyten aus peripherem Blut	35
3.2.12. DNA-Isolierung aus PBMZ und Granulozyten	36
3.2.13. Agarose-Gelelektrophorese	36

3.2.14. Kapillarelektrophorese der LZ-, PBMZ- und Granulozyten-PCR-Produkte	38
3.2.15. Statistik	40
4. Ergebnisse.....	41
4.1. Hundeparameter	41
4.2. Gesamtzellzahlen der Epidermis sowie Langerhans-Zellen	41
4.3. Reinheiten der isolierten Langerhans-Zellen	44
4.4. Elektronenmikroskopie	44
4.5. Zellzahl der Transplantate	47
4.6. Wiederherstellung der Zellularität im peripheren Blut.....	47
4.7. Chimärismusanalyse.....	50
4.7.1. Entwicklung des Spenderchimärismus im Blut	50
4.7.2. Chimärismus der Langerhans-Zellen	51
4.7.3. Vergleich Chimärismus der Langerhans-Zellen vs. PBMZ/Granulozyten	52
4.8. Toxische Komplikationen und Graft-versus-Host-Disease	55
5. Diskussion.....	56
5.1. Entwicklung der Langerhans-Zell-Zahlen	57
5.2. Zellregeneration im peripheren Blut.....	59
5.3. Transplantatanwachsen nach nicht-myeloablativer Konditionierung.....	61
5.3.1. Chimärismus im Blut.....	61
5.3.2. Chimärismus der Langerhans-Zellen	64
6. Zusammenfassung.....	68
7. Literaturverzeichnis.....	70
8. Thesen	79
9. Tabellarischer Lebenslauf.....	81
10. Selbstständigkeitserklärung	84
11. Danksagung	85

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Versuchsaufbau einer HSZT nach nicht-myeloablativer Konditionierung	25
Abb. 2: Präparation von Epidermiszellen und LZ	27
Abb. 3: Zellseparation der LZ mit der MACS-Technologie	28
Abb. 4: Durchflusszytometrie	31
Abb. 5: Gelelektrophorese der PCR-Produkte caniner VNTR-Regionen	37
Abb. 6: Chimärismusanalyse der Langerhans-Zellen mittels Kapillarelektrophorese.....	39
Abb. 7: Langerhans-Zell-Zahlen	43
Abb. 8: Elektronenmikroskopisches Bild einer Langerhans-Zelle	46
Abb. 9: Elektronenmikroskopische Darstellung der Birbeck Granula	46
Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Leukozytenregeneration nach der Transplantation	48
Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenregeneration nach der Transplantation	49
Abb. 12: Entwicklung des Spenderchimärismus im Blut	50
Abb. 13: Zeitlicher Verlauf des Chimärismus der LZ im Vergleich zum Chimärismus der Granulozyten und PBMZ Kompartimente.....	53

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Forward- (F) und Reverse-Sequenzen (R) der VNTR-Primer	33
Tab. 2: Charakteristika der Empfängerhunde	41
Tab. 3: Gesamtzellzahl pro Hautbiopsat.....	42
Tab. 4: Langerhans-Zell-Zahlen nach Isolierung	42
Tab. 5: CD1a-Anteil an der Positivfraktion (Angaben in %).	44
Tab. 6: Zellzusammensetzung der Transplantate.....	47
Tab. 7: Spenderchimärismus der Granulozyten, PBMZ sowie Langerhans-Zellen in der Post- Transplantationsphase (Angaben in %).....	54

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zellen (engl. antigen presenting cells)
BID	zweimal pro Tag (lat. bis in die)
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serumalbumin
CSA	Cyclosporin A
DLA	Hunde-Leukozytenantigen (engl. dog leukocyte antigen)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
FACS	Durchflusszytometrie (engl. fluorescence-activated-cell-sorting)
FCS	fötales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (engl. Granulocyte-Colony Stimulating Factor)
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (engl. Graft-versus-Host-Disease)
GvL-Effekt	Transplantat-gegen-Leukämie Effekt (engl. Graft-versus-Leukemia-Effect)
HLA	humane Leukozyten-Antigene
LZ	Langerhans-Zellen
MMF	Mycophenolat-Mofetil
p.o.	per os
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PBMZ	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. Phosphate buffered saline)
PBSZ	periphere Blutstammzellen
RIC	reduzierte Konditionierungsintensität
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
TBI	Ganzkörperbestrahlung (engl. total body irradiation)
TNC	totale nukleäre Zellzahl (engl. total nucleated cells)

1. Einleitung

1.1. Stammzelltransplantation

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist heutzutage fester Bestandteil in der Behandlung hämatologischer Neoplasien und wird zunehmend auch in der Behandlung einiger Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Bereits 1959 gelang es Arbeitsgruppen in Europa und Amerika mittels intravenöser Infusion von Knochenmarkstammzellen von Geschwisterspendern nach myeloablativer Ganzkörperbestrahlung (engl. total body irradiation, TBI) in Kombination mit einer hochdosierter Chemotherapie eine Eradikation des leukämischen Klon und eine anhaltende Etablierung der Spenderhämatopoese nachweisen zu können.¹ Nachdem in den Anfangszeiten nur Stammzellen aus dem Knochenmark, gewonnen durch Punktion und Aspiration aus dem Beckenkamm, zur Transplantation genutzt wurden, dienen seit 1990 zunehmend Stammzellen aus dem peripheren Blut als Stammzellquelle. Zur Mobilisierung der Stammzellen aus dem Knochenmark in das Blut wird der Spender für 4-5 Tage mit einem hämatopoetischen Wachstumsfaktor (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor, G-CSF) behandelt. Die peripheren Blutstammzellen (PBSZ) werden anschließend durch Leukapherese von den anderen Blutzellen separiert. Eine weitere Quelle zur Gewinnung von Stammzellen stellt Nabelschnurblut dar. Hierbei kann jedoch nur eine limitierte Anzahl von Zellen gewonnen werden, so dass Stammzellen aus Nabelschnurblut vorwiegend in der HSZT von Kindern eingesetzt werden.

Die gewonnenen Stammzellen werden mittels durchflusszytometrischer Messung des für hämatopoetische Stammzellen charakteristischen Oberflächenantigens CD34 identifiziert. Als adäquates allogenes Transplantat wird eine Mindestmenge von $2,0 \times 10^6$ CD34-positiven Zellen/kg Körpergewicht des Empfängers angesehen.

Unterschieden wird die HSZT in eine autologe und in eine allogene Transplantation. Bei der autologen Transplantation werden vom Patienten selbst gewonnene Stammzellen genutzt. Ziel ist es hierbei die Regeneration der Hämatopoese nach einer Hochdosischemotherapie, welche mit einer Knochenmarkablation und damit mit einer erhöhten Blutungsneigung sowie Infektionsgefahr einhergeht, zu beschleunigen und somit die therapiebedingte Mortalität deutlich zu reduzieren. Als Stammzellquelle der autologen Transplantation dienen überwiegend periphere Blutstammzellen, da diese zu einer schnelleren hämatopoetischen Regeneration führen als Stammzellen, die direkt aus dem Knochenmark gewonnen wurden.^{2,3,4}

Die häufigste Indikation für die autologe HSZT stellt heute das Multiple Myelom dar. Insgesamt entfallen ca. 90 % der autologen Transplantationen auf die Gruppe der lymphatischen Erkrankungen.⁵

Neben dem Multiplen Myelom beinhalten diese auch das Non-Hodgkin-Lymphom sowie den Morbus Hodgkin. Seltener Indikationen für die Durchführung einer autologen Transplantation stellen die Amyloidose sowie schwere Autoimmunerkrankungen dar.

Die allogene Transplantation ist durch die Verwendung von Stammzellen von gesunden Spendern charakterisiert. Sie wird vorwiegend bei den akuten Leukämien eingesetzt, hat jedoch auch Bedeutung bei der Behandlung der chronischen Leukämien, dem myelodysplastischen Syndrom sowie zunehmend auch bei der Behandlung von Lymphomen.^{6,7,8} Die Auswahl der Spender erfolgt basierend auf dem System der humanen Leukozyten-Antigene (HLA-System). Die HLA-Genorte weisen einen extrem hohen Polymorphismus auf. Als HLA-identisch bezeichnet man einen Spender, der in den transplantationsrelevanten Merkmalen HLA-A, -B, -C, -DRB₁ und -DQB₁ mit dem Empfänger übereinstimmt.⁹ Daneben spielen jedoch auch weitere Kriterien, wie Geschlecht, Alter, CMV-Status sowie Blutgruppenkonstellation eine Rolle bei der Spenderauswahl. Auch ist es möglich, im Falle eines fehlenden HLA-kompatiblen Spenders, die Transplantation mit einem HLA-haploidentischen (d.h. halbidentischen) Spender aus dem Familienkreis durchzuführen.¹⁰ Neben der Regeneration der Hämatopoese besteht bei der allogenen Transplantation die Wirkung vor allem auch in der Übertragung eines „neuen Immunsystems“ und einer damit einhergehenden möglichen Alloreaktivität des Transplantats gegen Zellen des Empfängers und somit unter anderen gegen noch vorhandene Tumorzellen. Dieser Effekt wird im Falle von Leukämien als Transplantat-gegen-Leukämie (engl. Graft-versus-Leukemia, GvL) Effekt bezeichnet und spielt eine entscheidende Rolle bei der Verringerung des Rezidivrisikos und Verlängerung des Gesamtüberlebens. Jedoch kann es auch zu dem Auftreten der Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (GvHD – engl. Graft-versus-Host-Disease) kommen, welche signifikant zur Morbidität und Mortalität nach HSZT beiträgt.

Auch bei der allogenen Transplantation werden vorwiegend Stammzellen aus dem peripheren Blut genutzt. Im Jahr 2011 sind in Deutschland 2439 allogene Transplantationen mit PBSZ im Vergleich zu 379 Transplantationen mit Knochenmark durchgeführt worden.¹¹ Jede Methode weist gewisse Vor- und Nachteile auf. So ist die Gewinnung von PBSZ einfacher als die operative Knochenmarkentnahme. Weiterhin induzieren PBSZ ein schnelleres Transplantatanwachsen und einen stärkeren GvL-Effekt als direkt aus dem Knochenmark gewonnene Stammzellen. Nachteilig wirkt sich hingegen die höhere Inzidenz der GvHD nach Transplantation von PBSZ aus.^{2,3,4} Auf Grund dieser Tatsache lässt sich allgemein feststellen, dass gerade bei bösartigen Grunderkrankungen und hier vor allem bei fortgeschrittenen Stadien periphere Blutstammzellen bevorzugt werden, da hier der GvL-Effekt eine wichtige Rolle spielt. Bei nicht-malignen Grunderkrankungen spielt dieser Effekt keine Rolle, so dass auch zur Verringerung des Auftretens einer GvHD vermehrt Knochenmark transplantiert wird.¹¹

1.2. Stammzelltransplantation mit reduzierter Konditionierung

Die ursprünglichen, myeloablativen Konditionierungsregime zielten durch eine hochdosierte zytostatische Therapie oft in Kombination mit einer TBI darauf ab, sowohl eine Eradikation der malignen Zellen als auch eine irreversible Schädigung der patienteneigenen Hämatopoese zu erreichen, um die Abstoßung des Transplantats zu verhindern. Diese klassischen Konditionierungsregime bestehen z.B. aus einer TBI mit 10-15 Gy in Kombination mit einer Chemotherapie mit Cyclophosphamid oder aus einer alleinigen kombinierten Chemotherapie mit Cyclophosphamid und Busulfan.¹² Insgesamt sind diese myeloablativen Konditionierungsregime mit einer ausgeprägten Toxizität verbunden, welche letztlich für die therapiebedingte Morbidität sowie Mortalität verantwortlich ist. Dies führte in der Vergangenheit dazu, dass eine Altersgrenze von 60-65 Jahren für eine autologe sowie 55-60 Jahren für eine allogene Transplantation empfohlen wurde. Dem individuellen Krankheitszustand mit entsprechender Komorbidität musste der Indikationsstellung zur Transplantation ebenfalls Rechnung getragen werden, was vor allem Patienten im höheren Alter betraf. In den letzten Jahren wurden Transplantationsverfahren mit reduzierter Konditionierungsintensität (engl. reduced intensity conditioning, RIC) entwickelt, so dass die therapiebedingte Toxizität der allogenen HSZT deutlich gesenkt werden konnte und eine Transplantation auch bei älteren Patienten mit entsprechenden Komorbiditäten ermöglicht wurde.^{13,14,15,16,17,18,19} Diese Therapie zielt hauptsächlich darauf ab, durch eine milde bis mäßige Immunsuppression ein Anwachsen des Transplantats zu ermöglichen. Die Eradikation der malignen Zellen im Empfänger wird vorwiegend durch den bereits genannten immunologisch vermittelten GvL-Effekt erzielt.^{20,21} Hierbei ist das vermehrte Auftreten eines gemischten Chimärismus zu beobachten, der durch das gleichzeitige Vorhandensein von sowohl Spender- als auch Empfängerzellen charakterisiert ist. Dieser gemischte Chimärismus nach HSZT kann auch dauerhaft persistieren, sagt dann jedoch häufig ein bevorstehendes Rezidiv der Grunderkrankung voraus.²² Eine Möglichkeit, das Anwachsen der Spenderzellen nach HSZT zu beeinflussen, liegt in der Transfusion von Spender-Lymphozyten. In Studien konnte gezeigt werden, dass es nach Lymphozytentransfusionen vom Spender zu einem schnelleren Anwachsen der Spenderzellen im peripheren Blut kommt. Leider zeigte sich auch, dass dies wiederum zu einer höheren Inzidenz der GvHD führt.^{23,24,25}

In den vergangenen Jahren war die Entwicklung geeigneter Therapieregime, welche mit einer geringen therapiebedingten Toxizität bei gleichzeitig gutem Anwachsen der Spenderzellen einhergehen, Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Therapieregime, die diese Kriterien erfüllen, bestehen heute zum Beispiel aus einer alleinigen TBI mit reduzierter Strahlendosis (2 Gy) oder einer TBI in Kombination mit einem Zytostatikum wie Fludarabin, welches als Purinanalogon eine starke immunsupprimierende Wirkung aufweist.^{15,26} Andere Therapieregime bestehen aus Fludarabin kombiniert mit einer anschließenden Immunsuppression mit Mycophenolat-Mofetil in niedriger Dosierung und Cyclosporin A (CSA) nach erfolgter Transplantation mit oder ohne vorheriger TBI.^{19,21} Mit der Zeit wurden viele

weitere unterschiedliche Regime erprobt.^{27,28}

Insgesamt konnte in Studien gezeigt werden, dass dosisreduzierte Regime zu einer geringeren Inzidenz der akuten GvHD sowie der therapiebedingten Mortalität führen. Gleichzeitig wurde jedoch eine erhöhte Rezidivrate verglichen zu myeloablativen Protokollen beobachtet.^{23,24,29} Hinsichtlich des Gesamtüberlebens konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden, wobei anzumerken ist, dass die Patienten in Studien mit reduzierten Konditionierungsregimen bereits eine höhere Komorbidität sowie ein höheres Alter aufwiesen und auch Patienten mit eingeschlossen wurden, die bereits ein Rezidiv nach vorheriger konventioneller HSZT erlitten hatten.^{23,30} Letztlich stellen RIC-Regime eine kurative Therapieoption auch für ältere Patienten sowie für bereits vorbehandelte Patienten und Patienten mit Komorbiditäten dar, welche sich sonst für herkömmliche myeloablative Therapieregime nicht qualifizierten. Das Indikationsspektrum der RIC umfasst bisher akute sowie chronische Leukämien, Lymphome, Morbus Hodgkin, multiple Myelome, myelodysplastische Syndrome, Osteomyelofibrosen und solide Tumore, wobei jedoch die akuten und chronischen Leukämien sowie maligne Lymphome die Hauptindikationen darstellen.

1.3. Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (Graft-versus-Host-Disease)

Bei der GvHD handelt es sich um eine Reaktion von allogenen T-Lymphozyten des Spenders gegen Zellen des Empfängerorganismus. Hierbei können unterschiedliche Organe des Empfängers in unterschiedlichem Ausmaße geschädigt werden. Die GvHD wird historisch abhängig vom Zeitpunkt des Auftretens nach Stammzelltransplantation in eine akute und in eine chronische Form unterschieden. Während sich die akute Form innerhalb von 100 Tagen nach der Transplantation ausbildet, manifestiert sich die chronische Form nach dem Tag 100 nach erfolgter Transplantation. Insgesamt muss jedoch festgehalten werden, dass diese historische Einteilung heutzutage auf Grund neuer Erkenntnisse mit neuen Therapieansätzen in der Transplantationsmedizin verlassen wird. Neuere Studien haben gezeigt, dass vor allem nach Transplantationen mit reduzierter Konditionierung die GvHD relativ spät auftreten kann. So wurde das klinische Bild der akuten GvHD noch deutlich nach Tag 100 bei Patienten mit RIC beobachtet.²⁹ Auch gibt es Studien, in denen man umgekehrt das Bild der chronischen GvHD schon einen Monat nach Stammzelltransplantation gesehen hat.³¹ Durch diese Beobachtungen kam es letztlich 2005 zu einer Änderung der Einteilung der akuten sowie chronischen GvHD durch das National Institutes of Health Consensus Development Project. Hier erfolgt die Einteilung in eine klassische akute GvHD bis Tag 100, eine „late onset“ akute GvHD nach Tag 100, ein Overlap-Syndrom mit einem Mischbild aus akuter und chronischer GvHD sowie in eine klassische chronische GvHD ohne Zeitlimit.³²

Die akute und chronische GvHD sind die führenden Ursachen für die weiterhin hohe Morbidität sowie Mortalität nach HSZT. Somit ist die Prophylaxe und Therapie der GvHD ein entscheidender Faktor für den Erfolg der HSZT. Eine Voraussetzung für die Entwicklung einer suffizienten GvHD-Prophylaxe ist das Verständnis der Pathophysiologie der GvHD, wobei hier viele verschiedene Mechanismen eine Rolle spielen. Für die Ausbildung einer GvHD sind Antigen-präsentierende Zellen (engl. antigen presenting cells, APC) vom Empfänger und eine Vielzahl entzündlicher Zytokine (z.B. Interleukin-2, TNF- α) sowie eine durch das Konditionierungsregime gesetzte akute Gewebs- und Endothelschädigung notwendig. Der pathophysiologische Mechanismus der Entstehung der GvHD besteht aus drei verschiedenen Phasen. Durch das Konditionierungsregime kommt es zunächst zu einer Schädigung des Gewebes des Empfängers, wodurch proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden. Diese wiederum aktivieren APC, welche gemeinsam mit proinflammatorischen Zytokinen die Aktivierung von alloreaktiven T-Lymphozyten des Spenders induzieren.³³ Verschiedene Effektorzellen (T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen) führen schließlich gemeinsam mit Makrophagen und natürlichen Killerzellen zur Schädigung des Zielgewebes des Empfängers. Vor diesem Hintergrund wird auch verständlich, weshalb RIC-Regime verglichen zu konventionellen myeloablativen Regimen zu einer niedrigeren Inzidenz der frühen GvHD führen. Sie verursachen eine deutlich geringer ausgeprägte Gewebeschädigung beim Empfänger.

Die Inzidenz der GvHD ist jedoch nicht nur abhängig vom Konditionierungsregime, sondern auch von der zur Transplantation verwendeten Stammzellquelle. In Studien konnte gezeigt werden, dass bei der Verwendung von Nabelschnurblut die Rate der GvHD bei gleicher HLA-Übereinstimmung geringer ist im Vergleich zu Knochenmark.³⁴ Dahingegen geht die Verwendung von PBSZ mit einer höheren Inzidenz der GvHD verglichen zu Knochenmark einher. Ursache ist hier die höhere T-Zell-Zahl im Transplantat, welche eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der GvHD spielt.³⁵

Zusätzliche Risikofaktoren für das Auftreten einer GvHD sind eine Geschlechtsdifferenz zwischen Spender und Empfänger sowie das Alter des Empfängers, wobei ein höheres Alter mit einer höheren Rate der Inzidenz der GvHD verbunden ist. Ein weiterer wichtiger Faktor, der mit der Inzidenz, Schwere und auch mit dem zeitlichen Auftreten einer GvHD korreliert, ist das Maß der HLA-Inkompatibilität.³⁶ Die Identifizierung eines HLA-identischen Spenders ist noch heute die wichtigste Maßnahme zur Vermeidung einer GvHD. So liegt bei Transplantationen zwischen HLA-identischen Geschwistern die Inzidenz der akuten GvHD-Grad III-IV bei 20 %. Eine Transplantation zwischen nicht verwandten Spender führt zu einer Inzidenz von 30 % und bei HLA-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger steigt die Wahrscheinlichkeit, eine akute GvHD Grad III-IV auszubilden sogar auf 40 %.³⁷ Auch die Inzidenz der chronischen GvHD steigt von 40 % bei Transplantationen zwischen HLA-identischen Geschwistern auf über 70 % bei der Transplantation zwischen nicht verwandten HLA-inkompatiblen Spendern.³⁸ Neue Therapieansätze konnten die Inzidenz der GvHD in den letzten 20

Jahren nicht wesentlich senken, wohl aber die Schwere der GvHD reduzieren.²⁹

Die Einteilung der akuten GvHD in Schweregrade hat ebenfalls wichtige prognostische Bedeutung. Es gibt verschiedene Scoring-Systeme, welche auf dem klinischen Ausprägungsgrad beruhen, so zum Beispiel die bereits 1974 von Glucksberg vorgeschlagenen Glucksberg-Seattle-Kriterien³⁹, welche sich aus dem Grad des Haut-, Darm-, und Leberbefalls zusammensetzen und vier verschiedene Schweregrade unterscheiden. Die Schwere der GvHD korreliert hier direkt mit dem Überleben. Insgesamt sind alle Organe, welche lymphoide Zellen sowie epitheliale Strukturen enthalten, Zielorgane der akuten GvHD. Dies sind vor allem die Haut, die Schleimhäute, die Leber und der Gastrointestinaltrakt, aber auch die Lunge und die Augen sowie der neuromuskuläre Apparat können betroffen sein. Das Bild der akuten GvHD der Haut kann zwischen einem leichten Pruritus mit Exanthemen, einer Erythrodermie mit zusätzlicher Blasenbildung und sogar einer bullösen Form mit Septikämien und Störungen des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes variieren. Wichtig für die Therapie der akuten GvHD der Haut ist die Abgrenzung zu möglichen anderen Ursachen der Exantheme wie zum Beispiel zu Virusexanthemen oder auch arzneimittelbedingten Exanthemen, so dass sich vor einer GvHD spezifischen Therapieeinleitung eine Biopsie zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose empfiehlt. Die akute GvHD des Gastrointestinaltraktes kann sich mit Übelkeit, Erbrechen, Anorexie und Diarrhöen bis hin zu Darmblutungen und Ileus zeigen. Bei schweren Verläufen liegt hier die Mortalität bei bis zu 60 %.

Die chronische GvHD hingegen imponiert eher wie ein sklerosierender Prozess und kann nahezu jede Autoimmunerkrankung nachahmen. Die wichtigsten Manifestationen sind u.a. Hautsklerosierungen, trockene Schleimhäute, Ulzerationen, Ausfall des Haupthaars, Ösophagusstrikturen, immungetriggerte Hepatitis sowie die Bronchiolitis obliterans. Mit 70-80 % ist die Haut am häufigsten betroffen.^{40,41} Der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung einer chronischen GvHD ist eine vorausgegangene akute GvHD, aber auch das Empfängeralter spielt eine entscheidende Rolle. Insgesamt versterben 15 % der Patienten, welche eine chronische GvHD erleiden. Einteilen kann man die chronische GvHD je nach dem Ausmaß der befallenen Körperoberfläche und Art der Hautbeteiligung in eine milde, moderate bis schwere sowie in eine generalisierte und umschriebene Form. Zudem unterteilt man nach Art des Beginns in eine 1) progressive Form, welche sich direkt an die akute GvHD anschließt und die schlechteste Prognose aufweist, 2) verzögerte Form, nach zunächst krankheitsfreiem Intervall, sowie 3) „De-novo-Form“, der keine akute GvHD vorausgegangen ist und die insgesamt die beste Prognose aufweist.

Eines haben alle Formen der akuten und chronischen GvHD gemeinsam. Als positiver Aspekt ihres Auftretens ist der damit einhergehende GvL-Effekt zu werten. Insbesondere die chronische GvHD trägt damit zur Tumorzellreduktion und Minderung von Rezidiven bei.

In der Prophylaxe der GvHD spielt eine möglichst gute Übereinstimmung der HLA-Merkmale zwischen

Spender und Empfänger eine wichtige Rolle. Zudem ist eine suffiziente Immunsuppression meist mit Cyclosporin in Kombination mit Methotrexat oder Mycophenolat-Mofetil (MMF) als Ersatz für Methotrexat oder auch Kortikosteroiden wichtig, um das Risiko einer GvHD zu senken. Bezüglich der Immunsuppression gibt es auch Versuche, Tacrolimus an Stelle von CSA einzusetzen. Weitere Ansätze in der GvHD-Prophylaxe sind die in vitro sowie in vivo T-Zell-Depletion (durch T-Zell gerichtete Antikörper), welche zu einer Reduzierung des Auftretens und der Schwere der GvHD führen. Langzeitstudien konnten jedoch hierunter kein verbessertes Gesamtüberleben nachweisen, da gleichzeitig höhere Raten von Transplantatabstoßungen, virusassoziierten Komplikationen sowie Rezidiven bei Leukämien zu verzeichnen waren.³³ Einen weiteren Ansatz stellt die Inaktivierung der APC dar, wobei dieser bisher nur auf wenige Zentren mit besonderer Expertise in experimentellen Transplantationsverfahren beschränkt ist.

In der Therapie der akuten GvHD wird seit Jahren erfolgreich Methylprednisolon eingesetzt. Jedoch gibt es auch steroidrefraktäre Formen, bei denen Anti-Lymphozyten-Globulin, Anti-Interleukin-2-Rezeptor-Antikörper, Antikörper gegen Tumornekrosefaktor- α sowie MMF therapeutisch eingesetzt werden.

Im Falle der chronischen GvHD besteht die Therapie der lokal limitierten Form aus topischen Steroiden, während das Standardregime der generalisierten Form aus einer systemischen Immunsuppression mit CSA in Kombination mit Prednisolon besteht. Bei einem Nichtansprechen dieser Kombinationstherapie stehen letztlich keine Standardtherapien mehr zur Verfügung. Alternativen, meist außerhalb kontrollierter klinischer Studien, bieten u.a. der Einsatz von MMF und Tacrolimus, D-Penicillamin, Azathioprin und Thalidomid sowie, bei isolierter kutaner chronischer GvHD, eine Photochemotherapie mit 8-Methoxypsoralen.^{42,43,44,45,46} Insgesamt ist eine kausale Therapie jedoch bis heute nicht möglich und jede immunsuppressive Therapie führt wiederum zu einer potenziellen Erhöhung der Morbidität und Mortalität durch unerwünschte Nebenwirkungen wie Virusinfektionen, Leber- und Knochenmarktoxizität sowie Tumorinduktion.

1.4. Langerhans-Zellen

Langerhans-Zellen (LZ) sind die dendritischen Zellen der Haut und gehören mit zu den potentesten Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems. Neben der Auslösung einer sekundären Immunantwort, sind sie auch in der Lage naive T-Lymphozyten zu prägen und somit eine primäre Immunantwort zu induzieren.⁴⁷ Entdeckt wurden die LZ erstmals 1868 mittels der Goldchlorid-Färbung durch Paul Langerhans, nach dem sie letztendlich auch benannt wurden. Wie die meisten dendritischen Zellen kommen auch die LZ ursprünglich aus dem Knochenmark, von wo aus sie in die

suprabasalen Schichten der Epidermis, in das Stratum spinosum, einwandern. Hier sind sie beim Menschen ab der 14 Embryonalwoche nachweisbar. LZ sind ca. 15-25 µm groß und weisen ein helles Zytoplasma auf. Sie sind weniger elektronendicht als die ebenfalls im Stratum spinosum liegenden Keratinozyten und besitzen einen gelappten Nukleolus. Zudem verfügen sie über lange Zellausläufer zur Vergrößerung ihrer Zelloberfläche. Mit diesen Zellausläufern bilden sie ein großes Netzwerk in der Epidermis. Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie verschiedene, für sie charakteristische Rezeptoren. Hierzu gehören unter anderem die Immunglobulinrezeptoren FcγRII/CD32, FcεRII/CD23 sowie der Rezeptor FcεRI.^{48,49,50,51} Weiterhin exprimieren LZ das Transmembranprotein Langerin, welches eine Rolle bei der rezeptorvermittelten Endozytose spielt, sowie das strukturell dem MHC-I-Komplex verwandte Glykoprotein CD1a, welches Lipid- und Glykolipidantigene für T-Zellen präsentieren kann. CD1a-Moleküle stellen einen spezifischen Marker von LZ dar und sind daher gut zur Unterscheidung der LZ von den übrigen Zellen der Haut geeignet.^{52,53} Ein weiteres charakteristisches Merkmal für LZ sind die nach dem Erstbeschreiber Birbeck (1961) benannten Birbeck Granula, welche elektronenmikroskopisch dargestellt werden können.⁵⁴ Sie kommen ausschließlich in LZ vor und sind damit das sicherste diagnostische Kriterium für diesen Zelltyp.⁵⁵ Birbeck Granula entstehen wahrscheinlich durch die rezeptorvermittelte Endozytose und sind eng an Langerin gebunden. Nach Bindung eines Antigens an Langerin wird das Antigen durch Endozytose aufgenommen und somit gelangen auch die Birbeck Granula in das Zytoplasma. Hierdurch wird verständlich, warum sich Langerin-Rezeptoren nicht nur auf der Zellmembran von LZ sondern auch in Birbeck Granula nachweisen lassen.⁵⁶ Elektronenmikroskopisch zeigen sich Birbeck Granula als länglich ovale Vesikel mit einer dunklen Innenstruktur, die entweder perinukleär oder in Kontinuität zur Plasmamembran liegen.⁵⁵ Ihre Form erscheint tennisschlägerähnlich, wenn sie im Kontakt zu einem Vesikel stehen. Diese Form entsteht durch die an der Spitze der Birbeck Granula liegenden „Coated Buds“, welche als morphologischer Hinweis auf die Rezeptor-vermittelte Endozytosevorgänge gelten.⁵⁷ Die Funktion der Birbeck Granula ist jedoch noch weitestgehend unklar. Man vermutet, dass sie eine Art Phagosomen darstellen und eine Bedeutung bei der Antigenprozessierung haben.

Beim Menschen sind die LZ regelmäßig auf der Körperoberfläche mit ca. 500-1000 LZ/mm² verteilt und machen in nicht entzündlich veränderter Haut einen Anteil von bis zu drei Prozent aller Zellen aus.⁵⁸ Auf eine LZ kommen somit circa 80 Keratinozyten, welche den Hauptteil der Epidermis bilden. Mit ihnen sind die LZ durch E-Cadherin verbunden, welche ebenfalls auf der Oberfläche der LZ exprimiert werden. Durch Aufnahme eines Antigens werden diese Glykoproteine herunterreguliert. Hierdurch wird die Verbindung zu den Keratinozyten gelöst und die Migration der LZ aus der Epidermis in die regionären Lymphknoten ermöglicht.^{59,60,61} Hier angekommen differenzieren sie zu interdigitierenden dendritischen Zellen. Während dieser Phase kommt es zu weiteren Reifungsprozessen, bei denen die LZ die Fähigkeit verlieren, weitere Antigene aufzunehmen. Sie ändern ihren Phänotyp und exprimieren

so unter anderem weniger CD1a und dafür mehr MHC I- sowie MHC II-Moleküle. Auch gehen während dieser Reifungsphase die Birbeck Granula verloren.^{62,63} Nach Erreichen der regionären Lymphknoten werden die aufgenommenen Antigene den T-Zellen präsentiert und damit die Expression von Zytokinen in T-Lymphozyten induziert. Dies führt zur Rekrutierung, Reifung und Proliferation sowohl der LZ als auch anderer Entzündungszellen.⁵²

Obwohl LZ dem Knochenmark entstammen und von hier aus in die Epidermis einwandern, konnte in Studien noch eine weitere mögliche Vervielfältigungsstrategie nachgewiesen werden. Man geht davon aus, dass LZ in der ruhenden Haut durch lokale Proliferation von Vorläuferzellen ersetzt werden können. So zeigten experimentellen Studien an Mäusen, welche mit einer myeloablativen Dosis bestrahlt wurden und die anschließend Knochenmark eines Spenders transplantiert bekamen, dass der Haplotyp der LZ auch 18 Monate nach der Transplantation noch vom Empfänger war, wohingegen die dendritischen Zellen anderer Organe schon den Haplotypen des Spenders trugen.⁶⁴ Bezüglich der unterschiedlichen Vervielfältigungsmöglichkeiten geht man davon aus, dass sich LZ in gesunder Haut vor allem durch diese Möglichkeit der lokalen Proliferation vermehren, wohingegen es durch inflammatorische Prozesse in der Haut vorwiegend zur Rekrutierung von LZ aus dem Knochenmark kommt.^{65,66} Insgesamt wird deutlich, dass LZ eine zentrale Rolle in der immunologischen Reaktion der Haut spielen.

Es existieren nur wenige Studien über die Entwicklung des Chimärismus in LZ nach HSZT. So konnten in einer weiblichen Patientin nach HSZT mit einem männlichen Spender durch in situ Y-Chromosomen-Analysen LZ vom Spender nachgewiesen werden.⁶⁷ Ferner wurde an einer kleinen Gruppe von männlichen Patienten gezeigt, dass LZ des Empfängers nach Stammzelltransplantation persistieren können, und es wurde bereits damals ein Einfluss dieser Empfängerzellen auf die Ausbildung einer GvHD postuliert.⁶⁸ Die These, dass LZ in der Pathophysiologie der GvHD eine Rolle spielen, wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Anzahl der LZ in der Haut von Patienten mit einer akuten Haut-GvHD im Vergleich zu Patienten ohne GvHD reduziert ist.^{69,70,71,72,73} Zudem konnte in tierexperimentellen Studien an Mäusen gezeigt werden, dass persistierende Empfänger-LZ nach HSZT zur Ausbildung einer GvHD führen, wenn man zusätzlich Spender-T-Zellen infundiert. Dies trifft jedoch nicht zu, wenn bereits alle LZ vom Spender sind. Darüber hinaus führt die Transfusion von Spender-T-Zellen auch zu einem raschen Austausch der Empfänger-LZ durch LZ des Spenders, wohingegen die Abwesenheit von T-Zellen im Transplantat dazu führen kann, dass sich zu keiner Zeit Spender-LZ in der Haut befinden.⁷⁴ In den wenigen, bisher veröffentlichten Studien über die Kinetik der LZ-Zahlentwicklung nach Transplantation mit RIC-Regimen sowie mit konventioneller Konditionierung zeigt sich nach myeloablativer Transplantation ein schnellerer Abfall der LZ bereits an Tag 0 (Tag der Konditionierung). Der Nadir der LZ-Zahl liegt in beiden Regimen ähnlich bei Tag 14-21. Das Auftreten einer GvHD scheint die Erholungszeit der LZ-Zahl zu verzögern.⁷⁵ Nach dem Auftreten einer GvHD der Haut konnte in

Studien im weiteren Verlauf ein kompletter Spenderchimärismus in den LZ nachgewiesen werden, wobei diese Beobachtung keine Aussage darüber erlaubt, ob ein kompletter Spendercharakter der LZ Ursache für das Auftreten der GvHD ist bzw. die GvHD die Ursache des kompletten LZ-Spenderchimärismus ist.^{66,75}

Weiterhin fiel auf, dass sich nach HSZT mit reduzierter Konditionierung ein unterschiedliches zeitliches Auftreten der vom Spender abstammenden LZ verglichen zu den peripheren Blutzellen zeigt. Noch lange nach Transplantation persistieren LZ des Empfängers, wohingegen die Zellen im Blut schon einen kompletten Spenderchimärismus aufweisen können.⁷⁵ Zudem zeigt sich nach allogener HSZT mit reduzierter Konditionierung eine verzögerte Ausbildung des Spenderchimärismus mit längerem Nachweis von Empfänger-LZ verglichen zu myeloablativen Regimen.⁷⁵ Dies ist entscheidend für die klinische Praxis, da man in diesem Persistieren der LZ des Empfängers nach RIC die Erklärung für das verspätete Auftreten der akuten GvHD der Haut vermutet. Diese Beobachtung kann demnach gleichzeitig als möglicher Angriffspunkt zur Prävention der akuten Haut-GvHD angesehen werden. Es gibt bereits Studien mit konventionellen Konditionierungsregimen, in denen die LZ vom Empfänger durch ultraviolettes Licht vor der Transplantation reduziert wurden, was zu einem schnelleren Anstieg des Spenderanteils in den LZ führte und damit auch zu einem verminderten Auftreten der akuten GvHD der Haut nach allogener T-Zell-Infusion.⁷⁴

Studien zur Kinetik der LZ-Zahl und der Chimärismusentwicklung in diesem Zellkompartiment nach nicht-myeloablativer 2 Gy TBI Konditionierung sind bisher nicht durchgeführt worden.

2. Aufgabenstellung

Die nicht-myeloablative Stammzelltransplantation findet heute zunehmend Einsatz in der klinischen Praxis. Es konnte gezeigt werden, dass unter Anwendung von Konditionierungsregimen mit reduzierter Intensität ein Transplantatanwachsen möglich ist. Durch die gleichzeitig geringere therapiebezogene Toxizität können vor allem ältere Menschen beziehungsweise Menschen mit vielen Komorbiditäten von dieser Therapieoption profitieren.

Nach nicht-myeloablativen Therapieregimen konnte eine Verzögerung im zeitlichen Auftreten der akuten GvHD der Haut beobachtet werden. Es ist bereits bekannt, dass LZ in der Haut eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der GvHD spielen. Der genaue Zusammenhang zwischen der Kinetik des LZ-Chimärismus und der Entwicklung der GvHD ist jedoch bislang unklar. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit die Chimärismusentwicklung der LZ in der Haut nach nicht-myeloablativer Konditionierung mit einer TBI von 2 Gy, anschließender Immunsuppression mit Cyclosporin A in Kombination mit dem m-TOR-Inhibitor Everolimus und HSZT von einem DLA-identischen Geschwistertier am Hundemodell untersucht werden.

Hierfür ist es zunächst Ziel der Arbeit, eine geeignete Methodik zur Isolierung von caninen LZ zu etablieren. Anschließend soll die Effektivität dieser Isolierungsmethode durch Bestimmung der erhaltenen Zellzahl sowie der Reinheit der isolierten LZ nachgewiesen werden. Zudem soll elektronenmikroskopisch durch Nachweis von Birbeck Granula bewiesen werden, dass es sich bei den isolierten Zellen um LZ handelt. Innerhalb definierter Zeiträume nach erfolgter Transplantation sollen die aus der Haut isolierten LZ hinsichtlich ihres Spenderchimärismus untersucht und mit der Chimärismusentwicklung in den PBMZ sowie Granulozyten verglichen werden. Der Fokus der Arbeit liegt darauf, die Fragestellung zu beantworten, ob es verglichen mit den publizierten Daten zu ursprünglichen Konditionierungsregimen nach nicht-myeloablativer Stammzelltransplantation zu einer zeitlichen Veränderung im Wechsel zwischen Empfänger- und Spender-LZ kommt und in wieweit es einen Zusammenhang zwischen der Chimärismusentwicklung der LZ und der Granulozyten und PBMZ gibt.

In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die akute GvHD der Haut nach nicht-myeloablativer Transplantation entgegen der ursprünglichen Einteilung auch noch nach Tag 100 beobachtet werden kann, und dass verbleibende Empfänger-LZ einen die akute GvHD auslösenden Faktor darstellen. In der vorliegenden Arbeit soll demnach insbesondere aufgezeigt werden, ob es nach nicht-myeloablativer Stammzelltransplantation mit der oben genannten Konditionierung zu einer längeren Persistenz (> 100 Tage nach HSZT) der LZ des Empfängers in der Haut kommt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Agarose	Biozym
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Aqua ad injectabilia	Braun
Araldit	Fluka, Buchs, Schweiz
Bleicitrat	Serva, Heidelberg
BSA	Serva, Heidelberg
dNTP, 100 mM	GE Healthcare
Ethanol	Zentralapotheke, Universität Rostock
EDTA, 0,5 M	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Roth
FKS	PAA
Glutaraldehyd, 4% ig	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Zentralapotheke, Universität Rostock
Magnesiumchlorid, 25 mM	GE Healthcare
Osmiumtetroxid, 1% ig	Merck, Darmstadt
PBS	Biochrom, Berlin
Povidon-Jod, Betaisodona®	Mundipharma
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Natrium-Thiosulfat NaSaO, 0,05% ig	Sigma
Trypanblau, 0,5% ig	Biochrom, Berlin
Uranylacetat	Merck, Darmstadt

3.1.2. Reagenzien und Enzyme

DNA-Längenstandard	Ge Healthcare
DNA-Längenstandard (ILS 600)	Promega
Borsäure	Carl Roth-GmbH + Co, Karlsruhe

Dispase I steriles Lyophilisat	Roche, Mannheim
DNase 10µl/ml	Roche, Mannheim
Formadid	Applied Biosystems, Darmstadt
Genomic DNA from Tissue-Kit	Machery-Nagel
NucleoBond® CB 100 Aufreinigungs-Kit	Machery-Nagel
Pancoll-Separationslösung	Cytogen
Primer	BioTeZ Berlin–Buch GmbH
Taq-Polymerase	GE Healthcare
Tris	Carl Roth-GmbH + Co, Karlsruhe
Trypsin, 2,5% ig	2,5 %, Biochrom

3.1.3. Puffer und Lösungen

Dispase I-Lösung	5 mg Dispase I, 5 ml PBS, 50 µl FKS und 50 µl Penicillin/Streptomycin
Gelladepuffer	Glycerin und Bromphenol-Xylencyanolblau, Carl Roth-GmbH + Co, Karlsruhe
MACSRunningBuffer	PBS mit 2 mM EDTA und 0,5 % BSA, Miltenyi Biotec
Natriumthiosulfat-Lösung	100 ml PBS mit 0,05 g Natriumthiosulfat
PCR-Puffer	Thermo Scientific
TBE-Puffer	54 g TRIS, 27,5 g Borsäure, 200 ml 0,05 mM EDTA Lösung, mit Aqua ad injectabilia auf 10 l
Transportmedium	20 ml RPMI, 200 µl FCS und 200 µl Penicillin/Streptomycin (1:1)
Trypsinlösung	0,25 %; 1 ml 2,5% ige Lösung zu 9 ml PBS mit 10 µg/ml DNase

3.1.4. Antikörper und MicroBeads

Antikörper/MicroBeads	Spezies	Hersteller
CD1a	canine - monoklonal (CA9.AG5) Isotyp IgG1	zur Verfügung gestellt von Dr. Peter F. Moore, VM Pathology/ Microbiology/Immunology, School of Veterinary Medicine, University of California
F(ab') ₂ anti-mouse IgG	rabbit - polyklonal	Biozol
Anti-mouse IgG MicroBeads	goat	Miltenyi Biotec

3.1.5. Geräte

ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Mannheim
Agarosegelkammer	BioRad
Durchflussszytometer FACSCalibur	Firma Becton & Dickinson
Geldokumentationssystem Transluminators/Kamera	Herolab
Kühlschrank	Liebherr
Kühltruhe, - 20 °C	Electrolux
Linearbeschleuniger; 10 MV X-ray	Siemens Primus
Mikroskop Eclipse E600	Nikon
Magnetischer Zell-Separator MiniMACS	Miltenyi Biotec
Nadelhalter	Aesculap
NanoDrop, ND-1000	Thermo Scientific
Neubauer-Zählkammer	Blau Brand
Pinzette, anatomisch	Aesculap
Pinzette, chirurgisch	Aesculap
Pipetten (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf
Thermocycler PTC-200	MJ Research
Transmissionselektronenmikroskop EM 902 A	Zeiss, Deutschland
Schere	Aesculap
Sterilwerkbank	Heraus-Instruments
Ultramikrotom Ultracut SWS	Leica, Wetzlar
Vakuumpumpe	Hassheide, Medizintechnik
Wasserbad	GFL

Zentrifuge, J6-MI	Beckman
Zentrifuge, 5418	Eppendorf

3.1.6. Verbrauchsmaterialien

Biopsiestanze Ø 8mm ²	Stiefel
Butterflykanüle 0,8 x 20 mm	Sarstedt
EDTA-Röhrchen, 1,5 ml	Sarstedt
Einmalpipetten (5, 10, 25, 50, 100 ml)	Eppendorf
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 0,5 ml	Eppendorf
FACS-Röhrchen, 5 ml Round-Bottom Tube, 12x75 mm	BD Falcon
Infusionsgerät, Intrafix SafeSet	Braun
Knochenmark-Aspirationsnadel	Medical Technologies
Kombistopper	Braun
Kupfer-Grids	Quantifoil Micro Tools, Jena
MACS Positiv-Selektionssäulen, large cell separation columns	Miltenyi Biotec
Multi-Adapter	SARSTEDT
Nahtmaterial, PET-Faden geflochten	Catgut GmbH
PCR-Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml/PCR clean	Eppendorf
Petrischale, 100/20 mm	Greiner
Einmal-Rasierer	PFM Medical
S-Monovette	SARSTEDT
Transferpack 600 ml	Baxter
Transfusionsbeutel 150 ml	Baxter
Transfusionssystem	Baxter
Trapsystem	Promecon
Schere	Aesculap
Spritzen (5, 10, 20 ml)	Braun
Zellfilter 40 µm	BD Bioscience, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Greiner Bio One

3.1.7. Medikamente und medizinische Produkte

Braunol-Lösung	B. BRAUN
Cyclosporin A, Sandimmun®	Novartis
Enrofloxacin, Baytril®	Bayer
Everolimus (Certican)	Novartis
Ketaminhydrochlorid, 10% ig	Bela-Pharm
Penicillin/ Streptomycin, 10000 U/ml/10000 µg/ml	Biochrom
Xylazinhydrochlorid, Rompun® 2 %	Bayer

3.2. Methoden

Alle Experimente wurden durch den Überprüfungsausschuss des Landesamts für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei in Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (M-V/TSD/7221,3-1,1-048/07).

3.2.1. Versuchstiere

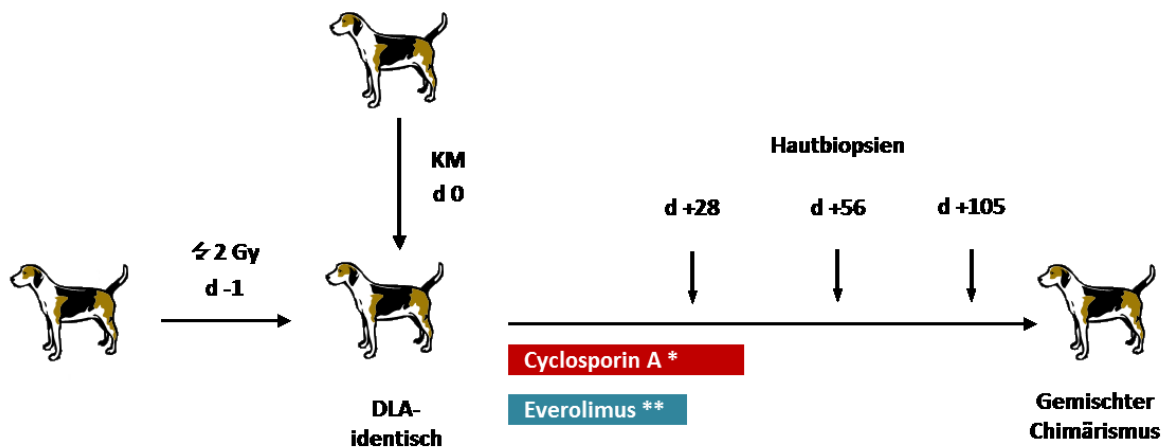
Für die Untersuchung standen neun gesunde reinrassige Beagle-Hunde zur Verfügung, die aus der Zucht eines Versuchstierzüchters (Harlan & Winkelmann) stammen, der eine Genehmigung zur Zucht und Haltung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken gemäß § 11 Abs. 1 Nr. 1 des Tierschutzgesetzes besitzt. Alle Hunde waren im Vorfeld entwurmt und gegen Tollwut, Parainfluenza canis, Leptospirose, Hepatitis contagiosa canis, Parvovirose und Hundestaupe geimpft. Durch die Abstimmung hoch polymorpher DLA Klasse I und Klasse II Mikrosatelliten-Marker wurden zur Transplantation geeignete DLA-identische Empfänger/Spender Zwillinge ermittelt.

3.2.2. Durchführung der Knochenmarktransplantation

Die Empfänger-Hunde erhielten zunächst eine nicht-myeloablativen Ganzkörperbestrahlung von 2 Gy mit einer Dosisrate von 0,25 Gy/min eines hochenergetischen Linearbeschleunigers (Siemens Primus; 10 MV X-ray). Die Bestrahlung erfolgte unter Narkose, welche aus 10 mg/kg Ketamin und 2 mg/kg Xylazin intramuskulär (Musculus biceps femoris) bestand. Anschließend erfolgte ebenfalls unter der oben beschriebenen Narkose die Entnahme von Knochenmark von einem Leukozyten-Antigen-identischen Geschwisterhund. Als Punktionsstellen dienten hierfür Humerus, Femur und Beckenkamm. Es wurden jeweils 10 ml Knochenmarkblut je kg Körpergewicht des Empfängers entnommen. Innerhalb von 24 h nach der Bestrahlung wurde das Knochenmark ($1,9\text{--}11,8 \times 10^8$ Zellen/kg - Median $3,7 \times 10^8$ Zellen/kg) intravenös transfundiert. Der Tag der Knochenmarktransplantation wurde als Tag 0 festgelegt. Alle transplantierten Hunde erhielten eine Immunsuppression bestehend aus Cyclosporin A per os (Novartis, Sandimmun®, 2 x 15 mg/kg/d; Tag -1 bis +35) sowie Everolimus per os (Novartis, Certican®, 2 x 0,25 mg/d; Tag 0 bis +27). Zur Kontrolle der Hunde nach Transplantation wurden zweimal täglich klinischen Kontrollen durchgeführt. Ferner wurden regelmäßige Blutbilduntersuchungen sowie Kontrollen der Retentionswerte und Leberwerte

vorgenommen (1-2 x pro Woche bzw. bis zu täglichen Kontrollen bei klinischer Verschlechterung des Allgemeinzustandes) (siehe auch Junghanss et al., 2012). Als Leukopenie wurde eine Leukozyenzahl von $< 1,0 \times 10^9/l$ bezeichnet. Eine Thrombozytopenie wurde als ein Abfall der Thrombozyten auf $< 20 \times 10^9/l$ definiert. Bei einer Leukopenie erhielten die Hunde eine antibiotische Abschirmung mittels Enrofloxacin (Baytril®, Bayer, 5 mg/kg/d p.o.) als Infektionsprophylaxe. Bei einer Thrombozytenzahl unter $10 \times 10^9/l$ erfolgte die Transfusion eines Thrombozytenkonzentrates. Je nach Klinik und Dynamik des Hämoglobin-Abfalls erfolgte die Transfusion von bestrahltem Vollblut.

Versuchsaufbau



* 15 mg/kg BID p.o.; d -1 bis +35 ** 0,25 mg BID p.o.; d 0 bis +27

Abb. 1: Versuchsaufbau einer HSZT nach nicht-myeloablativer Konditionierung

Am Vortag der HSZT (d -1) wird der Empfänger mit einer 2 Gy Ganzkörperbestrahlung konditioniert. Am Tag 0 (d 0) erfolgt die HSZT mit Knochenmark (KM) eines DLA-identischen Geschwisterhundes. Die Immunsuppression besteht aus einer 2 x täglichen (BID) Gabe von Cyclosporin A sowie Everolimus. Die Hautbiopsate werden vor der Konditionierung sowie zu den in der Abbildung angegebenen Zeitpunkten und je nach Verlauf der Transplantation auch an weiteren Tagen entnommen.

3.2.3. Hautbioptate

Die Hautbioptate wurden vor der Transplantation sowie am Tag +28, +56, und +105 nach HSZT entnommen. Hunde, bei denen ein Transplantatanwachsen in den Blutzellen oder LZ nachzuweisen war, wurden auch noch nach Tag +105 (bis max d +609) hinsichtlich der Entwicklung des Chimärismus in den Blutzellen sowie in der Haut untersucht. Einen Tag vor Entnahme der Bioptate wurde das Transportmedium unter der Sterilwerkbank in einem 50 ml Röhrchen angesetzt und im Kühlschrank über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Vor der Entnahme des Hautbioptats erfolgte eine Anästhesie des Hundes (siehe 3.2.2.). Im Bereich des Nackens wurde anschließend eine 4 x 2 cm große Fläche freirasiert und die Haut sorgfältig desinfiziert. Anschließend wurden mit Hilfe einer Biopsiestanze (Ø 8 mm), welche ein zylindrisches Messer aufweist, zwei Bioptate (2 x 50,3 mm²) entnommen. Die Stanze wurde dafür unter drehender Bewegung durch die Epidermis und Dermis bis in das subkutane Fettgewebe geführt, so dass das zu entnehmende Gewebe von den Kollagenfasern der retikulären Dermis vollständig getrennt wurde. Mit einer Schere wurde das Biopat vom restlichen Fettgewebe abgetrennt und in das vorbereitete Transportmedium überführt. Die Hautläsionen wurden anschließend mit Einzelnähten geschlossen und die Fäden am 10. postinterventionellen Tag gezogen.

3.2.4. Präparation von Epidermiszellen

Nach dem Transport ins Labor wurden die Bioptate sofort unter der Sterilwerkbank weiterverarbeitet. Zunächst wurden die Gewebestücke desinfiziert. Hierfür wurden die Bioptate mit Hilfe einer sterilen Pinzette in 10 ml Povidon-Jod überführt und darin für 10 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach erfolgte eine 5-minütige Inkubation in 15 ml PBS ebenfalls bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die infolge der Povidon-Jod-Behandlung verfärbten Bioptate in 15 ml einer 0,05% igen Natriumthiosulfat-Lösung für 5 min bei Raumtemperatur unter langsamen Schwenken entfärbt. Danach wurden die Bioptate nochmals in 15 ml PBS für 5 min langsam wippend gewaschen. Anschließend wurden die Gewebestücke in 5 ml einer Dispase I-Lösung gegeben und für 24 h bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde die Probe 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Enzym Dispase spaltet Kontakte der Hemidesmosomen in der Basallamina der Epidermis und der dermalen Ankerfibrillen (Kollagen Typ VII) in der dermo-epidermalen Junctionszone. Die Proben wurden anschließend in eine mit PBS gefüllte Petrischale gegeben. Mit Hilfe von zwei sterilen Pinzetten wurde das Hautbiopat fixiert und die Epidermis von der Dermis abgezogen. Die Epidermis wurde in 10 ml einer 0,25% igen Trypsinlösung gegeben, welche mit 100 µg DNase versetzt wurde und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bioptate in der Trypsinlösung mit einer 1000 µl Pipette auf-

und abgezogen, um die Zellen aus der Epidermis zu lösen. Trypsin ist ein Enzym, welches die Spaltung der Zell-Zell-Kontakte über Desmosomen (Desmocolline und Desmogleine) und über Adhärenzkontakte (E-, P-, N-Cadherine) von epidermalen Zellen ermöglicht. Danach wurde die Zellsuspension durch einen Nylon-Zellfilter in ein 50 ml Röhrchen überführt und zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion 10 ml FKS zugegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension zweimal bei 200 x g für 8 min bei 10 °C (Bremsfunktion 6) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension erneut in 10 ml PBS gewaschen und zentrifugiert (200 x g, 8 min, 10 °C, Bremse 6). Das Pellet wurde in 500 µl MACSRunningBuffer (MRB) mit 10 mM EDTA resuspendiert. MRB enthält vom Hersteller bereits 2 mM EDTA, so dass zur Herstellung von MRB mit 10 mM EDTA jeweils 1,6 ml 0,5 M EDTA zu 100 ml MRB zugegeben wurden. Zur Zellzählung wurden 10 µl der Zellsuspension mittels Trypanblau eingefärbt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt (siehe 3.2.6.).

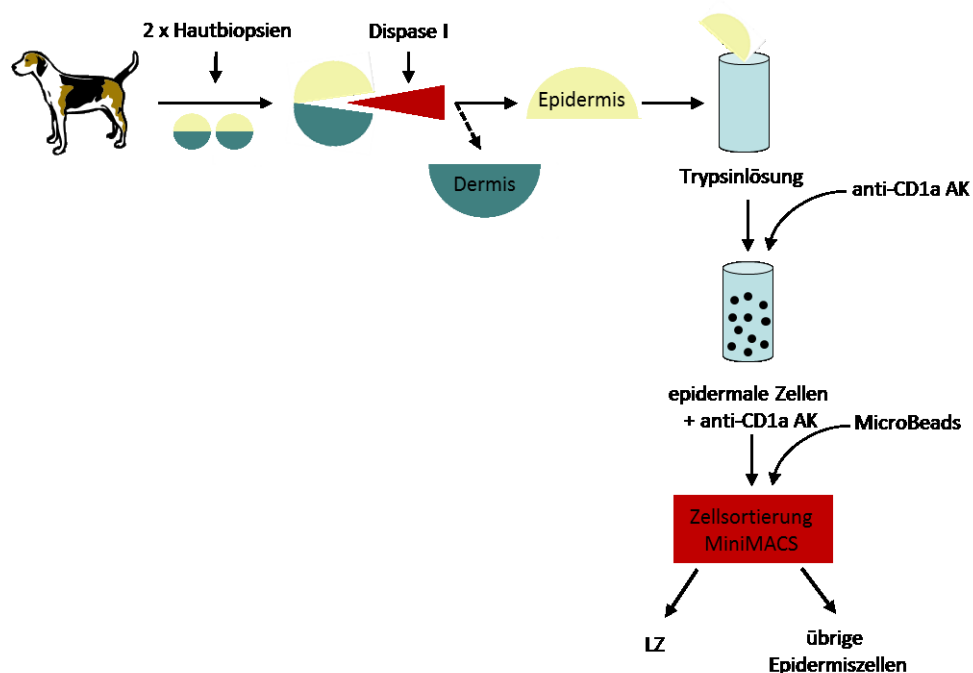


Abb. 2: Präparation von Epidermiszellen und LZ

Die Hautbiopsate werden mittels einer Dispase I-Lösung in ihre Bestandteile Epidermis und Dermis getrennt. Anschließend werden die epidermalen Zellen durch eine Trypsinlösung aus der Epidermis gelöst. Zur Isolierung der LZ aus den epidermalen Zellen werden der Zellsuspension LZ spezifische anti-CD1a AK zugegeben. Durch die weitere Zugabe von MicroBeads, welche an die durch anti-CD1a AK markierten LZ binden, werden die LZ mittels der MACS-Technologie von den übrigen Epidermiszellen separiert.

3.2.5. Isolierung der Langerhans-Zellen

Die Zellseparation der LZ erfolgte mit der MACS-Technologie nach dem Prinzip der Positivseparation.

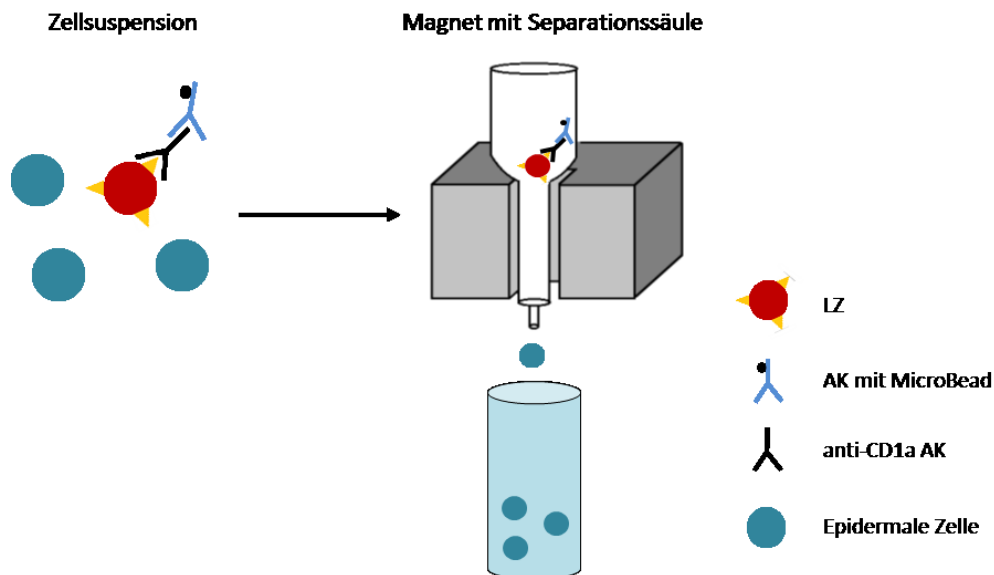


Abb. 3: Zellseparation der LZ mit der MACS-Technologie

Die Zellseparation der LZ erfolgt nach dem Prinzip der Positivseparation. Hierbei werden die LZ durch einen für sie spezifischen Antikörper (anti-CD1a AK) markiert. An diesen Antikörper wiederum koppelt sich ein weiterer Antikörper, der mit MikroBeads (magnetische Kleinstpartikel) beladen ist. Die Zellsuspension mit den markierten LZ durchläuft anschließend eine Separationssäule. Diese befindet sich in einem Magneten, so dass die LZ durch die an sie gekoppelten magnetischen MikroBeads in der Separationssäule zurückgehalten und so von dem Rest der Zellen separiert werden können.

Die Epidermiszellsuspension (siehe 3.2.4.) wurde zentrifugiert (200 x g, 6 min, 10 °C, Bremse 6). Anschließend wurden vorsichtig mit einer Pipette 320 µl vom Überstand abpipettiert. Zur Probe wurden 20 µl eines murinen anti-CD1a Antikörpers zur Markierung der LZ zugegeben und die Probe für 15 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend wurden 10 ml MRB hinzugegeben und die Probe zentrifugiert (200 x g, 8 min, 8 °C, Bremse 6), der Überstand dekantiert und das Pellet erneut in 80 µl MRB resuspendiert. Der Zellsuspension wurden dann 20 µl eines anti-Maus-Antikörpers, der an magnetische Mikrokügelchen (MicroBeads) konjugiert ist, zugegeben und die Probe bei 4 °C im Kühlschrank für 15 min inkubiert. Anschließend wurden 10 ml MRB zugegeben und die Zellsuspension zentrifugiert (200 x g, 8 min, 8 °C, Bremse 6). Das Zellpellet wurde dann in 500 µl MRB resuspendiert und es folgte die Zellseparation am MiniMACS (Abb. 2. u. 3.) mit large-cell-Separationssäulen. Dafür

wurde die large-cell-Separationssäule in den Einsatz des MiniMACS-Magneten positioniert und als Flusswiderstand am unteren Ende eine 23 G-Kanüle aufgesetzt. Die Säule wurde einmal mit 500 µl MRB vorgespült. Danach wurde die Säule mit der Zellsuspension beladen. Die aus der Kanüle tretende Zellsuspension wurde als CD1a-negative Fraktion in einem FACS-Röhrchen aufgefangen. Die Säule wurde anschließend über ein neues Sammelröhrchen positioniert, mit 1 ml MRB beladen und aus dem Magneten entfernt. Durch Druck mit einem Stempel wurden die zuvor magnetisch zurückgehaltenen Zellen aus der Säule eluiert und als CD1a-positive Fraktion gesammelt. Um den Reinheitsgrad zu erhöhen wurde dieser Vorgang noch zweimal wiederholt. Die Zellen der Positiv-Fraktion wurden erneut zentrifugiert (200 x g, 6 min, 8 °C, Bremse 6), der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 500 µl PBS resuspendiert. Die Zellen der Positiv-Fraktion wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (siehe 3.2.6.). Jeweils die Hälfte einer Probe wurde zur späteren DNA-Isolierung und Chimärismusanalyse bei - 20 °C eingefroren. Die andere Hälfte der Probe wurde zur Durchflusszytometrie genutzt.

3.2.6. Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer sowie Trypanblau verwendet. Der Farbstoff Trypanblau dient dabei zur Überprüfung der Vitalität der Zellen, da der Farbstoff nur die Membran toter Zellen passieren kann und so das Zytoplasma dieser Zellen blau färbt. Für die Zellzählung wurden 10 µl einer Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gefärbt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Pipettenspitze wird dazu an die Kante der Zählkammer gebracht. Durch wirkende Kapillarkräfte wird die Zellsuspension zwischen Deckglas und Kammer gesaugt. Unter dem Mikroskop werden anschließend vier der großen Quadrate der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die genaue Zellzahl wird wie folgt berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = n * V_f * V * 10^4$$

n = Anzahl der Zellen eines Quadrates (d.h. bei vier ausgezählten Quadraten Zellzahl/4)

V_f = Verdünnungsfaktor

V = Volumen der Zellsuspension

10⁴ = Kammerfaktor

3.2.7. Elektronenmikroskopie

Die Aufbereitung der LZ zur elektronenmikroskopischen Untersuchung erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Prof. Dr. Jonas, Medizinische Biologie der Universität Rostock.

Initial wurden die isolierten LZ dreimal gewaschen. Hierfür wurden die Zellen in 2 ml PBS resuspendiert, abzentrifugiert (200 x g, 6 min, 8 °C, Bremse 6) und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die LZ in 4% igem Glutaraldehyd in PBS-Puffer für 1 h fixiert. Es erfolgte ein erneuter Waschvorgang. Das Zellpellet wurde dann in 1% igem Osmiumtetroxid (OsO_4) für 1 h inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang in Aqua dest wurden die Zellen in 0,1% iger Agarose aufgenommen, welche zuvor in einem Wasserbad auf 40 °C erwärmt wurde. Die Zellen wurden anschließend für 20 s bei 10000 U/min zentrifugiert und zum Aushärten auf Eis gelegt. Das Zellpräparat wurde dann nacheinander in Pufferwaschlösungen mit steigenden Alkoholkonzentrationen gelegt, um es zu waschen und zu dehydrieren. Anschließend wurden die Zellen in reinem Araldit gebettet. Nach Polymerisation der Proben wurden in einem Ultramikrotom Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 50-70 nm angefertigt. Die Schnitte wurden auf Kupfer-Grids aufgefangen und mittels Uranylacetat für 15 min kontrastiert und danach mit Aqua dest gespült. Abschließend wurden die Proben mit Bleicitrat kontrastiert und nach einem erneuten Spülvorgang mit Aqua dest unter einem Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

3.2.8. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, Zellen nach der Größe, der Granularität und der Expression von Oberflächenantigenen sowie der Expression von intrazellulären Molekülen zu differenzieren.

In der hier beschriebenen Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Expression des Oberflächenantigens CD1a nach Anreicherung am MiniMACS (siehe 3.2.5.) als Maß der Reinheit angewendet. Es wurde sowohl die Zellsuspension der CD1a-positiven als auch der CD1a-negativen Fraktion analysiert, um die Effektivität der Separation zu überprüfen. Die Messungen wurden mit einem FACSCalibur vorgenommen. Es wurden jeweils 1000 Ereignisse der CD1a-positiven und 10000 Ereignisse der CD1a-negativen Fraktion gemessen (Abb. 4). Die Steuerung und Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software CellQuest Pro 4.0.2. (Becton & Dickinson).

In Vorbereitung auf die durchflusszytometrische Messung wurden die Zellsuspensionen zunächst zentrifugiert (200 x g, 8 min, 8 °C, Bremse 6) und der Überstand dekantiert. Zur verbliebenen

Restflüssigkeit wurden jeweils 50 µl des 1:20 verdünnten fluoreszenz-markierten (PE) sekundären Antikörpers gegeben und die Probe 15 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Danach erfolgte ein Waschdurchgang. Hierfür wurde die Probe nach Zugabe von 2 ml PBS zentrifugiert (200 x g, 6 min, 8 °C, Bremse 6) und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde resuspendiert und die Zellsuspension bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

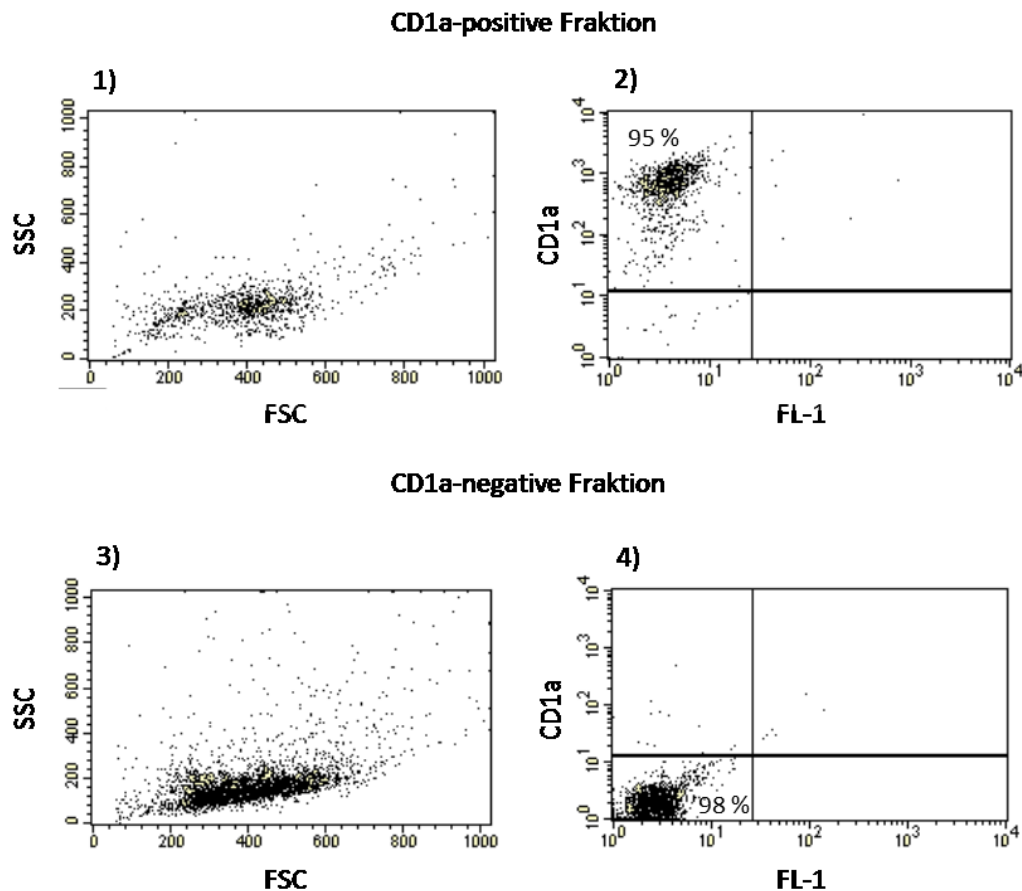


Abb. 4: Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Messung der CD1a-positiven (1 u. 2) sowie CD1a-negativen Fraktion (3 u. 4). In den Diagrammen 1 und 3 sind die Zellgröße (Forward Scatter, FSC) gegen die Zellgranularität (Side Scatter, SSC) dargestellt. Die Diagramme 2 und 4 stellen die CD1a-Färbung und die Autofluoreszenz im Grünbereich dar (FL-1). **1)** Lichtstreuung aller gemessenen Zellen in der CD1a-positiven Fraktion. Die LZ bilden eine relativ homogene Fraktion in der Mitte des Bildes. **2)** Dot-Plot der Fluoreszenz-positiven Zellen. Durch eine Software wird der prozentuale Anteil der CD1a-positiven Zellen, hier im oberen linken Quadranten, berechnet und so der Reinheitsgrad der CD1a-positiven Fraktion bestimmt. **3)** Darstellung der Lichtstreuung aller gemessenen Zellen in der CD1a-negativen Fraktion. **4)** Dot-Plot der Negativfraktion zur Kontrolle.

3.2.9. Isolierung der DNA aus angereicherten Langerhans-Zellen

Die Isolierung der DNA aus den angereicherten LZ erfolgte mit dem Genomic DNA from Tissue-Kit nach Anweisung des Herstellers mit freundlicher Unterstützung durch Frau Meißner, Rechtsmedizin Rostock.

Hierfür wurde die eingefrorene LZ-Suspension aufgetaut (siehe 3.2.5.) und zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 200 µl PBS abgenommen und das Zellpellet darin resuspendiert. Auf die Zellsuspension wurden 180 µl T1-Puffer und 25 µl Proteinase K gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 56 °C wurden 300 µl vom B3-Puffer dazugegeben und es folgte eine erneute Inkubation bei 70 °C für 10 min. Der T1-Puffer sowie die Proteinase K dienen dabei der Vorbereitung auf das anschließende Herauslösen der DNA aus der Zellsuspension durch den B3-Puffer. Zur Fällung der DNA wurden danach 210 µl Ethanol zugegeben. Die Probe mit der gelösten DNA wurde nun in ein Röhrchen mit einer Silica-Membran (NucleoSpin®Tissue column) überführt, welches auf ein Auffangröhrchen gesetzt wurde. Durch anschließendes Zentrifugieren für eine Minute bei 11000 x g wurde die DNA so von der restlichen Flüssigkeit getrennt, da sie durch die Silica-Membran zurückgehalten wird und in der NucleoSpin®Tissue column verbleibt. Die übrige Flüssigkeit sammelt sich im Auffangröhrchen und wird verworfen. Um die auf der Silica-Membran liegende DNA möglichst von allen Restbestandteilen zu befreien, erfolgten zwei Waschvorgänge mit zwei weiteren Pufferlösungen (BW-, B5-Puffer). Hierfür wurden 500 µl des BW-Puffers über die Membran gegeben, zentrifugiert (eine Minute bei 11000 x g) und die Flüssigkeit im Auffangröhrchen verworfen. Danach wurden 600 µl des B5-Puffers (Waschpuffer mit Ethanol) auf die Membran gebracht und zentrifugiert (eine Minute bei 11000 x g). Nachdem die Flüssigkeit im Auffangröhrchen erneut verworfen wurde, folgte eine weitere Zentrifugation für eine Minute bei 11000 x g, um auch das restliche Ethanol des B5-Waschpuffers zu entfernen. Anschließend wurde das Auffangröhrchen gegen ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß ausgetauscht und 50 µl auf 70 °C erwärmter BE-Puffer in die NucleoSpin®Tissue column mit der isolierten DNA gegeben und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt dient dazu, die DNA aus der NucleoSpin®Tissue column herauszuwaschen, so dass sie sich durch Zentrifugieren für eine Minute bei 11000 x g in dem darunter positionierten Eppendorf-Gefäß sammelt. Die nun isolierte DNA wurde im nächsten Schritt direkt zur Replikation mittels PCR verwandt.

3.2.10. LZ-DNA-Replikation mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR - engl. polymerase chain reaction) beruht auf der in vitro Synthese von spezifischen DNA-Sequenzen an einer Einzelstrangmatrix. Diese DNA-Sequenzen liegen jeweils zwischen zwei definierten Oligonukleotiden, die zu einem Strang am 3' Ende dieser Sequenz komplementär sind (forward und reverse Primer). Für die hier durchgeführten Chimärismusanalysen wurden sog. variable number of tandem repeats (VNTR) als DNA-Zielsequenz ausgewählt. Diese entsprechen wiederholenden Sequenzen innerhalb nichtkodierender DNA-Abschnitte. Sie sind polymorph und individuell hoch spezifisch und somit zur Unterscheidung zwischen einzelnen Individuen, z.B. zwischen Spender und Empfänger, bestens geeignet. In einer Hybridisierungsreaktion („Annealing“) werden diese Primer (Tab. 1.) an den gewünschten Nukleinsäureeinzelnstrang jeweils am 5'-Ende gebunden. Für die spätere Kapillarelektrophorese sind die Forward-Primer jeweils am 5' Ende mit Fluorescein markiert. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase [Taq (Thermus aquaticus)-DNA-Polymerase] und ausreichenden Mengen der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) erfolgt die Synthese des gewünschten DNA-Abschnittes in mehreren Zyklen. Jeder Zyklus beinhaltet die Denaturierung des Produktes, die Primer-Hybridisierung und die Elongation.

Tab. 1: Forward- (F) und Reverse-Sequenzen (R) der VNTR-Primer

Primer	Länge	Oligonukleotidsequenz	Markierung
2137 F	21 mer	5'-GCAGTCCCTTATTCCAACATG-3'	5'Fluorescein
2137 R	20 mer	5'-CCCCAAGTTTTGCATCTGTT-3'	
2319 F	23 mer	5'-GGAACACTGTATCCTCAGTGTCC-3'	5'Fluorescein
2319 R	20 mer	5'-TGGGAAGGAAGGAAGTGTG-3'	
2611 F	20 mer	5'-GAAGCCTATGAGCCAGATCA-3'	5'Fluorescein
2611 R	22 mer	5'-TGTTAGATGATGCCTTCCTTCT-3'	

Die isolierte DNA wurde zunächst in 40 µl Aqua dest eluiert und es erfolgte eine Konzentrationsmessung am Spektralphotometer „Nanodrop“. Anschließend erfolgte die Amplifikation der LZ-DNA mittels der PCR. Hierfür wurde ein PCR-Reaktionspuffer (Master Mix) angesetzt, welcher für einen 50 µl-Ansatz aus jeweils 30 ng LZ-DNA, 5 µl 10-fach PCR-Puffer, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 5 µl Desoxynukleotid-Triphosphaten (dNTP), je 0,5 µl Forward- und Reverse-Primern und 0,2 µl der hitzebeständigen DNA-Polymerase Taq bestand. Die Probe wurde abschließend mit Aqua ad

injectabilia auf 50 µl aufgefüllt. Zum Ausschluss von DNA-Kontaminationen wurde zusätzlich ein Ansatz nur mit Aqua ad injectabilia anstelle von LZ-DNA als Negativkontrolle angesetzt. Je nach verwendetem Primer wurden folgende Programme im Thermocycler durchgeführt:

Primer 2137

- | | | |
|--------------|-------|---------------|
| 1. T = 95 °C | 5 min | Denaturierung |
| 2. T = 94 °C | 40 s | Denaturierung |
| 3. T = 63 °C | 40 s | Annealing |
| 4. T = 72 °C | 40 s | Elongation |

Wiederholung 2.-4. 29 x

- | | | |
|--------------|-------|--|
| 5. T = 72 °C | 5 min | |
|--------------|-------|--|

Primer 2319

- | | | |
|--------------|-------|---------------|
| 1. T = 95 °C | 5 min | Denaturierung |
| 2. T = 94 °C | 40 s | Denaturierung |
| 3. T = 65 °C | 40 s | Annealing |
| 4. T = 72 °C | 40 s | Elongation |

Wiederholung 2.-4. 34 x

- | | | |
|--------------|-------|--|
| 5. T = 72 °C | 5 min | |
|--------------|-------|--|

Primer 2611

- | | | |
|--------------|-------|---------------|
| 1. T = 95 °C | 5 min | Denaturierung |
| 2. T = 94 °C | 40 s | Denaturierung |
| 3. T = 62 °C | 40 s | Annealing |
| 4. T = 72 °C | 40 s | Elongation |

Wiederholung 2.-4. 34 x

- | | | |
|--------------|-------|--|
| 5. T = 72 °C | 5 min | |
|--------------|-------|--|

Die amplifizierte LZ-DNA wurde zur quantitativen und qualitativen Kontrolle einer Agarosegelelektrophorese unterzogen (siehe 3.2.13.). Anschließend wurden die Proben bei - 20 °C

eingefroren und dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Rostock zur Chimärismusanalyse übergeben.

3.2.11. Isolierung der PBMZ und Granulozyten aus peripherem Blut

Vor und nach der Transplantation wurde den Hunden zur Chimärismusanalyse der peripheren Blutzellen in wöchentlichen Intervallen Blut am Vorderlauf abgenommen. Um langfristig die Gerinnung des Blutes durch die Komplexierung der Calcium-Ionen zu verhindern, wurden Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA)-haltige Monovetten zur Blutabnahme verwendet. Anschließend erfolgte die Isolierung der Granulozyten und der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) durch eine Dichtegradientenzentrifugation. Hierfür wurde eine Pancoll-Separierungslösung verwendet mit einer für Hundeblut charakteristischen Dichte von $\rho = 1,074 \text{ g/ml}$. Das Prinzip der Separation besteht darin, dass die Blutbestandteile während der Zentrifugation je nach Dichte durch die Lösung hindurch wandern oder sich in der Interphase bzw. darüber sammeln.

Das EDTA-Hundeblut wurde 1:1 mit PBS in einem 50 ml Röhrchen vermischt. In ein zweites Röhrchen wurde ein dem Hundeblut identisches Volumen an Pancoll pipettiert und langsam mit dem Hundeblut-PBS-Gemisch überschichtet. Danach erfolgte die Zentrifugation für 12 min bei 4 °C und 1140 x g ohne Bremse. Daraus resultierte eine Schichtung der einzelnen Blutbestandteile im Röhrchen, wobei sich Granulozyten und Erythrozyten aufgrund ihrer höheren Dichte unterhalb der Pancoll-Schicht und die PBMZ mit ihrer geringeren Dichte in der Interphase als weiß-gelbliche Schicht zwischen dem plasmahaltigen Überstand und dem Pancoll absetzen. Die PBMZ wurden dann vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Es erfolgten zwei Waschschrte mit PBS und anschließender Zentrifugation (200 x g, 10 min, 4 °C). Nachdem die Pancoll-Schicht mit einer Vakuumpumpe abgesaugt wurde, konnte die darunter liegende Schicht, welche Granulozyten und Erythrozyten beinhaltet, mit der Pipette abgenommen werden. Für die Erythrozytenlyse wurden diese Zellen mit 40 ml einer 0,25 M Ammoniumchlorid-Lösung (NH₄CL) versetzt und für 25 min bei 40 °C im Wasserbad im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 30 ml PBS, um die lysierten Bestandteile zu entfernen.

3.2.12. DNA-Isolierung aus PBMZ und Granulozyten

Die Isolierung der DNA aus den einzelnen Zellfraktionen erfolgte mit dem NucleoBond® CB 100 Aufreinigungs-Kit nach Anweisung des Herstellers. Die Zellen wurden hierfür zunächst in 5 ml G2-Puffer resuspendiert, danach mit 100 µl Proteinase K vermischt und das Gemisch für 60 min bei 50 °C inkubiert. Danach wurden 5 ml N2-Puffer, welcher eine geringe Ionenstärke und einen sauren pH-Wert aufweist, zur Probe gegeben und 15 s bei maximaler Geschwindigkeit gevortext. Anschließend wurde die Probe auf eine ebenfalls mit 2 ml N2-Puffer equilibrierte NucleoSäule gegeben. Nach drei Waschschritten mit je 4 ml N3-Puffer wurde die DNA mit 5 ml N5-Puffer eluiert. Zum Fällern der DNA wurden der Probe 3,5 ml Isopropanol zugegeben und die Probe für 10 min zentrifugiert bei 1400 rpm. Nachdem die überstehende Flüssigkeit abpipettiert wurde, wurde das Pellet mit 1500 µl 70% igem Ethanol in ein Eppendorf-Gefäß überführt und erneut zentrifugiert (10 min/ 1400 rpm) und der Überstand dekantiert. Bei Raumtemperatur wurde das Pellet für 30 min getrocknet und dann je nach Größe des Pellets in 50-200 µl H₂O resuspendiert. Die isolierte DNA wurde im Spektralphotometer „Nanodrop“ gemessen. Danach erfolgte die Amplifikation der PBMZ- und Granulozyten-DNA mittels der PCR (siehe 3.2.10.) und einer anschließenden Gelelektrophorese (siehe 3.2.13.).

3.2.13. Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, bei der geladene Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Nettoladungen in einem elektrischen Feld unterschiedlich schnell wandern und somit im Gel aufgetrennt werden können.

Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelen mit 2,5% igem Agarosegelen. Hierfür wurden zunächst 6,25 g Agarose durch Kochen in 250 ml des TBE-Puffers gelöst und dann durch leichtes Schwenken des Glasgefäßes unter kaltem Wasser etwas abgekühlt. Danach wurde dem Gel 10,6 µl einer 1% igen Ethidiumbromidlösung zugesetzt, welche mit den Basenpaaren der DNA interkaliert und dazu führt, dass die DNA im UV-Licht fluoresziert. Das Gel wurde nun in einen Gelträger gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wurden je 8 µl der amplifizierten DNA mit 4 µl Gelladepuffer gemischt und in die einzelnen Taschen pipettiert. Zudem wurde eine Tasche mit der PCR-Negativkontrolle (mit Aqua anstelle von LZ-DNA) bestückt und eine weitere mit 7 µl eines Längenstandards einer 100 Basenpaar-Leiter. Die Elektrophorese erfolgte dann bei Raumtemperatur unter einer konstanten Spannung von 100 V. Anschließend wurden die Gele zur Beurteilung der amplifizierten DNA-Menge

sowie der Qualität mittels eines Transluminators unter UV-Licht bei 312 nm analysiert und zur Dokumentation mit einer CCD-Kamera (Software EasyWin32) fotografiert (siehe Abb. 5).

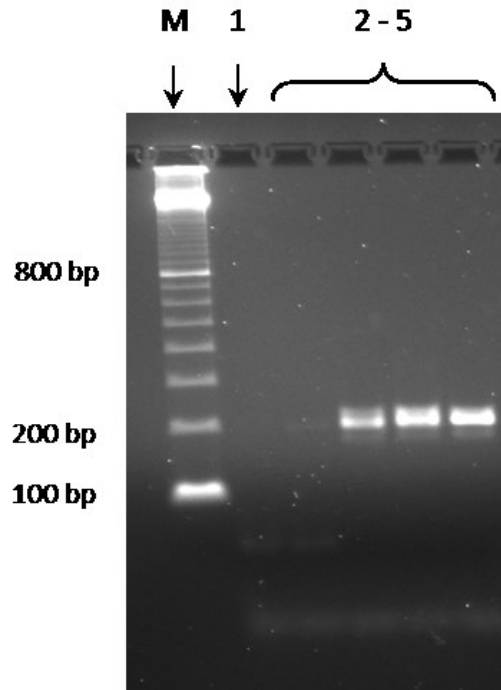


Abb. 5: Gelelektrophorese der PCR-Produkte caniner VNTR-Regionen

Zur Kontrolle der DNA-Qualität der PCR-Produkte erfolgte im Anschluss an die PCR der LZ-DNA eine Gelelektrophorese. Hier dargestellt ist ein exemplarisches Gelbild verschiedener LZ-DNA-PCR-Produkte aufgetragen gegen einen 100 Bp-Längenstandard/Marker (M). In den folgenden Spuren finden sich die aufgetragene Negativkontrollen mit Aqua (1) sowie die PCR-Produkte der LZ-DNA verschiedener Tiere (2-5).

3.2.14. Kapillarelektrophorese der LZ-, PBMZ- und Granulozyten-PCR-Produkte

Die Kapillarelektrophorese zur Chimärismusanalyse erfolgte mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Rostock.

Das Prinzip der Kapillarelektrophorese ist die Bewegung von geladenen Molekülen unter Einfluss eines elektrischen Feldes. Der Vorgang läuft in einer Kapillare ab, in der die amplifizierten und fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente gemäß ihrer Größe bzw. Basenpaarlänge durch ein Gel wandern und dabei nach Anregung durch einen Laser eine spezifische Fluoreszenz emittieren. Diese wird mit einem mitlaufenden Standard verglichen, so dass letztlich eine Beurteilung hinsichtlich der Länge und der DNA-Menge der Probe möglich ist. Die Ergebnisse werden dann mit Hilfe einer Software in ein Kurvendiagramm nach Fragmentlänge und Signalintensität dargestellt und die Integrale der Kurven quantifiziert (siehe Abb. 6). Aus dem Größenverhältnis der berechneten Flächen ergibt sich schließlich das anteilige Verhältnis zwischen Spender und Empfänger. Die prozentualen Anteile der Spender- und Empfänger-DNA in einer Probe werden wie folgt berechnet:

$$\text{Anteile der Empfänger DNA in \%} = 100 \times \frac{\text{Fläche Empfänger}}{\text{Fläche Spender} + \text{Fläche Empfänger}}$$

In Vorbereitung auf die Kapillarelektrophorese wurden jeweils 2 µl des PCR-Produktes mit je 23 µl Formadid und 2 µl Längenstandard in einem Eppendorf-Röhrchen versetzt. Die Ansätze wurden anschließend für 3 min bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt, damit die Einzelstränge getrennt bleiben. Die Elektrophorese erfolgte mit dem Polymer POP 4 bei einer Injektionsspannung von 3 kV und einer Laufzeit von 3 min. Zur Auswertung wurde die Peak Scanner Software 1.0 von Applied Biostystems verwendet.

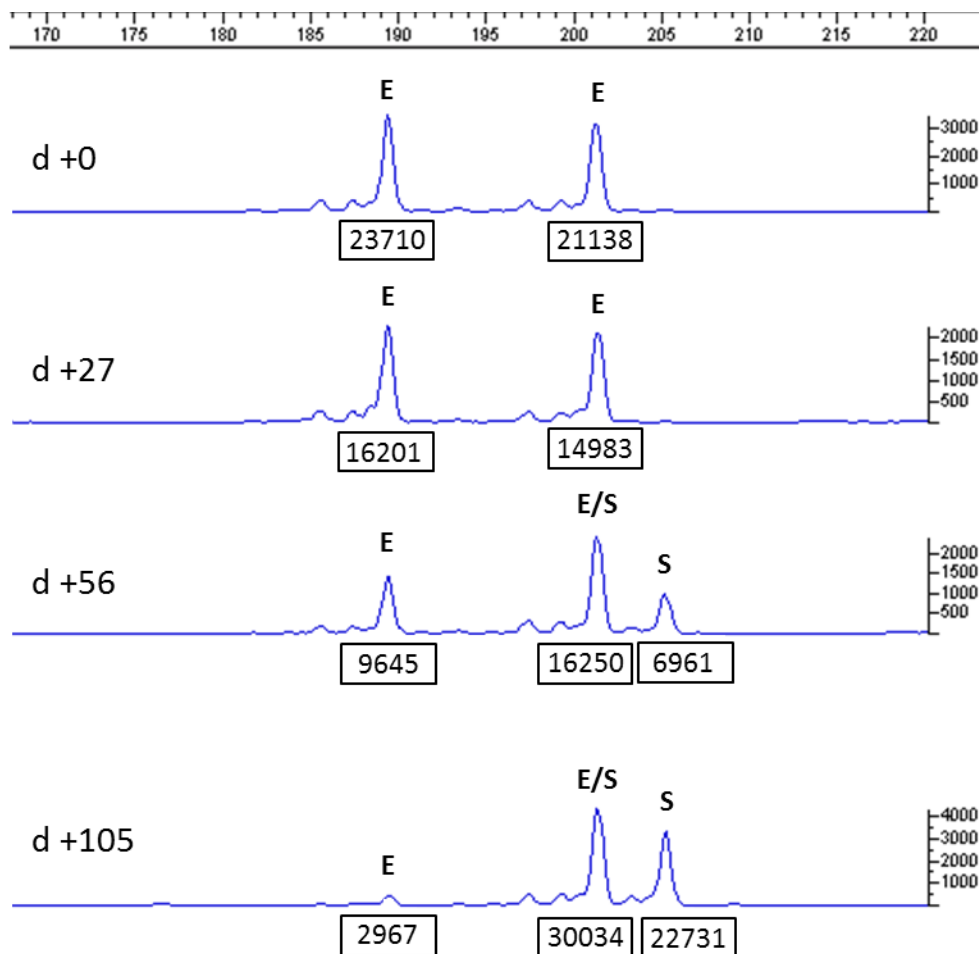


Abb. 6: Chimärismusanalyse der Langerhans-Zellen mittels Kapillarelektrophorese

Dargestellt sind die Kurvendiagramme nach Kapillarelektrophorese der LZ-PCR-Produkte eines Tieres an den Tagen 0, +27, +56 und +105 nach HSZT. Die Peaks des Empfängerhundes liegen bei 189 bp sowie 201 bp (E), die DNA-Amplifikate des Spenders weisen Fragmentlängen von 201 bp und 205 bp (S) auf. Da die Basenpaarabfolge bei 201 bp sowohl beim Empfänger als auch beim Spender auftritt, wird sie nicht zur Chimärismusanalyse herangezogen (E/S). Die Berechnung erfolgt somit aus den DNA-Amplifikaten mit den Fragmentlängen von 189 bp sowie 205 bp. Am Tag 0 und Tag +27 sieht man ausschließlich Peaks vom Empfänger (E). Ab Tag +56 nimmt die Fläche unter der Kurve des Empfängers ab, zusätzlich zeigt sich eine neue Kurve, die bei 205 bp liegt und somit dem Spender zuzuordnen ist (S). Setzt man nun die Flächen zueinander ins Verhältnis ergibt sich der jeweilige Spender- und Empfängeranteil.

3.2.15. Statistik

Die statistische Analyse und Darstellung der erhobenen Daten wurde unter Verwendung des Statistikprogramms SPSS (IBM SPSS Statistics Version 21) sowie der Software Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Plus 2010, Microsoft Corporation) durchgeführt.

Zur statistischen Auswertung der relevanten Daten wurden der Mann-Whitney-U-Test sowie der Wilcoxon-Rangsummentest herangezogen. Beim Mann-Whitney-U-Test handelt es sich um einen verteilungsfreien Test, mit dem man die zentrale Tendenz zweier unabhängiger Stichproben vergleichen kann. Der Wilcoxon-Rangsummentest ist ebenfalls ein nicht-parametrischer Test und das Äquivalent zum Mann-Whitney-U-Test. Er vergleicht, ob die zentrale Tendenz zweier verbundener Stichproben unterschiedlich ist. Diese Testverfahren eignen sich vor allem zur statistischen Auswertung von Messgrößen, die keiner Normalverteilung unterliegen sowie zur Auswertung von Stichproben mit geringen Fallzahlen. Geprüft wird jeweils die Nullhypothese H_0 , welche besagt, dass sich die beiden verglichenen Stichproben nicht unterscheiden. Entsprechend gilt die Annahme eines Unterschieds zwischen beiden Stichproben als Alternativhypothese H_1 .⁷⁶

Als Signifikanzniveau wurde die Grenze von 5 % gewählt. Ist der errechnete p-Wert kleiner oder gleich 0,05, kann die Nullhypothese verworfen und das Ergebnis als statistisch signifikant bezeichnet werden.

4. Ergebnisse

4.1. Hundeparameter

In unseren Versuchen wurden insgesamt neun Hunde auf die Chimärismusedwicklung der LZ sowie der Granulozyten und PBMZ nach nicht-myeloablativer HSZT untersucht. Zu Beginn der Studie lag das Alter der Hunde zwischen 11 und 29 Monaten (Median 16 Monate). Das Gewicht der Hunde lag zwischen 9,8-14,6 kg (Median 12,4 kg). Ausgewählte Charakteristika der Empfängertiere zum Zeitpunkt der Transplantation sowie die Häufigkeit notwendiger Bluttransfusionen in der post-Transplantationsphase sind in der Tabelle 2 zusammengestellt (siehe auch Junghanss et al., 2012).

Tab. 2: Charakteristika der Empfängerhunde

Hunde	Alter (Monate)	Gewicht (kg)	Geschlecht E	Geschlecht S	Bluttransfusion
1	10,5	13,6	m	m	-
2	12,4	9,8	w	m	1
3	18,9	14,0	m	w	2
4	17,1	12,6	m	m	1
5	15,8	11,2	m	m	-
6	13,9	12,2	w	w	3
7	16,0	12,6	m	m	1
8	14,2	12,4	m	m	-
9	29,4	14,6	w	w	2
Median	15,8	12,4			

E = Empfänger, S = Spender, w = weiblich, m = männlich

4.2. Gesamtzellzahlen der Epidermis sowie Langerhans-Zellen

Bei allen Hunden wurden einheitlich vor Transplantation sowie an den Tagen +28, +56 und +105 nach erfolgter Transplantation Hautbiopsate sowie Blut entnommen. Hunde, bei denen auch noch nach Tag +56 ein Spenderchimärismus in den Blutzellen nachgewiesen wurde, wurden auch noch nach Tag +105 hinsichtlich des LZ-Chimärismus untersucht (Hautbiopsate bis maximal d +609 nach Transplantation). Insgesamt wurden somit in unserer Studie 50 Hautbiopsate mit jeweils 101 mm² auf den Chimärismus der LZ untersucht.

Aus den 101 mm² großen Hautbiopstaten konnten vor HSZT im Median 130 x 10⁴ (Spannweite: 81 x 10⁴–210 x 10⁴) Hautzellen gewonnen werden (Tab. 3). Zunächst zeigte sich bereits an Tag +28 nach HSZT eine deutliche, gegenüber der Ausgangszellzahl vor HSZT jedoch nicht-signifikante Abnahme der isolierten Zellzahl (Median: 103,8 x 10⁴ vs. 130,0 x 10⁴; p = n.s.). Anschließend kam es zu einer Regeneration der Hautzellen und zum Erreichen des medianen Ausgangswertes bis zu den Tagen +140-299.

Tab. 3: Gesamtzellzahl pro Hautbiopstat

Hunde	vor HSZT	Zeit nach HSZT (d)					
		+28	+56	+105	+140-299	+300-400	> +400
1	91,3	101,0	84,3	68,0	-	-	-
2	107,3	107,5	94,8	†	†	†	†
3	90,8	70,8	84,0	68,3	142,0	-	156,0
4	80,8	96,3	105,8	127,5	196,0	-	155,3
5	209,8	167,3	181,3	119,0	-	284,0	246,0
6	150,6	103,8	89,3	95,0	100,0	168,0	164,5
7	176,3	89,5	146,3	70,0	128,8	158,0	175,5
8	169,5	135,0	191,0	156,5	141,8	215,8	-
9	130,0	157,0	192,0	178,5	106,0	-	-
Median	130,0	103,8	105,8	107,0	135,3	163,0	164,5

Angegeben sind die Zellzahlen der Epidermis aus jeweils 101 mm² Hautbiopstat (Zellzahl x 10⁴). † Hund verstarb an Tag +60 nach HSZT.

Tab. 4: Langerhans-Zell-Zahlen nach Isolierung

Hunde	vor HSZT	Zeit nach HSZT (d)					
		+28	+56	+105	+140-299	+300-400	> +400
1	2,3	1,5	0,8	0,4	-	-	-
2	1,9	0,8	3,8	†	†	†	†
3	2,0	0,3	1,5	1,9	4,1	-	6,4
4	0,8	1,5	1,1	4,3	7,1	-	10,5
5	13,5	5,6	11,6	9,7	-	10,9	9,0
6	3,0	2,0	3,0	1,5	1,1	6,4	5,6
7	4,5	3,4	7,2	0,3	4,5	4,1	3,8
8	5,3	0,8	5,3	6,0	8,6	1,9	-
9	4,1	1,9	2,6	3,4	6,0	-	-
Median	3,0	1,5*	3,0**	2,7	5,3	5,3	6,4

Angegeben sind die LZ-Zahlen der Epidermis aus jeweils 101 mm² Hautbiopstat (Zellzahl x 10⁴). † Hund verstarb an Tag +60 nach HSZT. *p < 0,05 (LZ-Zahl Tag +28 vs. vor HSZT); ** p < 0,05 (LZ-Zahl Tag +56 vs. Tag +28 nach HSZT)

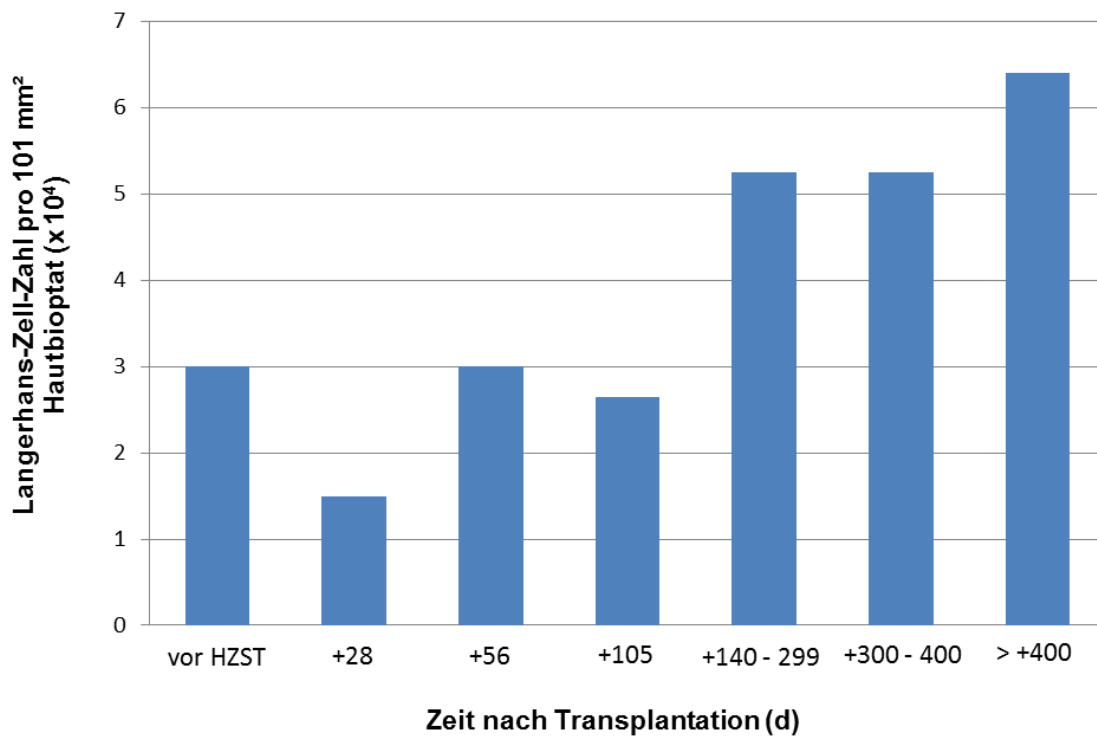


Abb. 7: Langerhans-Zell-Zahlen

Dargestellt sind die LZ-Zahlen pro 101 mm² Hautbiopsat (Zellzahl x 10⁴) vor sowie zu verschiedenen Zeiten nach nicht-myeloablativer HSZT.

Aus den gewonnenen Hautzellen konnte eine mediane LZ-Zahl von $3,6 \times 10^4/101\text{mm}^2$ isoliert werden, wobei die Werte von $0,3 \times 10^4$ – $13,5 \times 10^4$ Zellen pro Hautbiopsat variierten (Tab. 4). Nach erfolgter Transplantation war zunächst bis Tag +28 nach HSZT ein signifikanter Abfall der LZ-Zahl gegenüber der Ausgangszellzahl zu verzeichnen (Median: $3,0 \times 10^4$ vs $1,5 \times 10^4$; $p < 0,05$). Im Verlauf des Beobachtungszeitraumes konnte ein Anstieg der isolierten LZ bis Tag +56 mit einem erneuten, aber gegenüber Tag +56 nicht-signifikanten Abfall der LZ-Zahl bis Tag +105 nach HSZT beobachtet werden (Median: $3,0 \times 10^4$ vs $2,7 \times 10^4$; $p = \text{n.s.}$). Anschließend konnte wiederum ein Anstieg der Zellzahlen bis Tag nach +400 verzeichnet werden (Abb. 7).

Auch variierte der prozentuale Anteil der LZ an der isolierten Gesamtzellzahl aus der Epidermis (Spannweite: 0,4–8,2 %). Als Ausgangswert zeigte sich am Tag vor der Transplantation ein medianer prozentualer Anteil der LZ an der Gesamtzellzahl von 2,5 %. An Tag +28 war der stärkste Abfall des LZ-Anteils zu beobachten (im Median 1,5 %). Bis Tag +56 kam es wiederum zu einem Anstieg des LZ-Anteils auf 2,8 %. An Tag +105 sahen wir erneut einen Abfall auf 2,3 % mit erneutem Anstieg des LZ-Anteils an

Tag +140-299 mit 3,6 % über das Niveau des Ausgangswertes. Auch an den folgenden gemessenen Tagen lagen die medianen prozentualen Anteile der LZ an der isolierten Gesamtzellzahl über dem Niveau des medianen Ausgangswertes (Tag +300-400 3,2 %, Tag > +400 3,7 %).

4.3. Reinheiten der isolierten Langerhans-Zellen

Nach der Isolierung der LZ am MiniMACS wurde der prozentuale Anteil der CD1a-positiven Zellen und somit der Anteil der LZ an der erhaltenen Positivfraktion mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. Die mediane LZ-Reinheit der mittels MiniMACS erhaltenen CD1a-Positivfraktion betrug 88 % (Spannweite: 28–97 %). Zusammenfassend sind die erzielten Reinheiten nach Isolierung der LZ aus der Haut der Empfängertiere vor sowie nach Transplantation in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: CD1a-Anteil an der Positivfraktion (Angaben in %)

Hunde	vor HSZT	Zeit nach HSZT (d)					
		+28	+56	+105	+140-299	+300-400	> +400
1	69	81	82	81	-	-	-
2	93	79	88	†	†	†	†
3	42	69	69	68	84	-	93
4	82	73	72	78	89	-	94
5	92	90	93	97	-	95	94
6	28	34	67	67	87	93	93
7	97	73	88	78	93	92	89
8	97	79	91	88	92	87	-
9	91	87	94	89	90	-	-
Median	91	79	88	79	89	93	93

† Hund verstarb an Tag +60 nach HSZT.

4.4. Elektronenmikroskopie

Um sicherzustellen, dass es sich bei den isolierten Zellen um LZ handelt, wurden elektronenmikroskopische Bilder angefertigt. Es konnten die für LZ typischen Zellausläufer sowie das helle, wenig elektronendichte Zytoplasma der LZ dargestellt werden (Abb. 8). Zudem zeigten sich sowohl an der Zelloberfläche als auch bereits internalisiert im Zytoplasma die zur Isolierung angewandten MicroBeads (Abb. 8, 9). Das sicherste ultrastrukturelle diagnostische Kriterium zur

Identifizierung von LZ stellen jedoch die Birbeck Granula dar, welche in den Abbildungen 8 b) sowie 9 zu sehen sind. In der Abbildung 9 b) sieht man die charakteristische stäbchenförmige Gestalt der Birbeck Granula. In Abbildung 8 b) erkennt man die ebenfalls mögliche tennisschlägerähnliche Form, welche durch die an der Spitze der Birbeck Granula liegenden Coated Buds entsteht. Diese Coated Buds gelten als morphologischer Hinweis auf die Rezeptor-vermittelten Endozytosevorgänge.

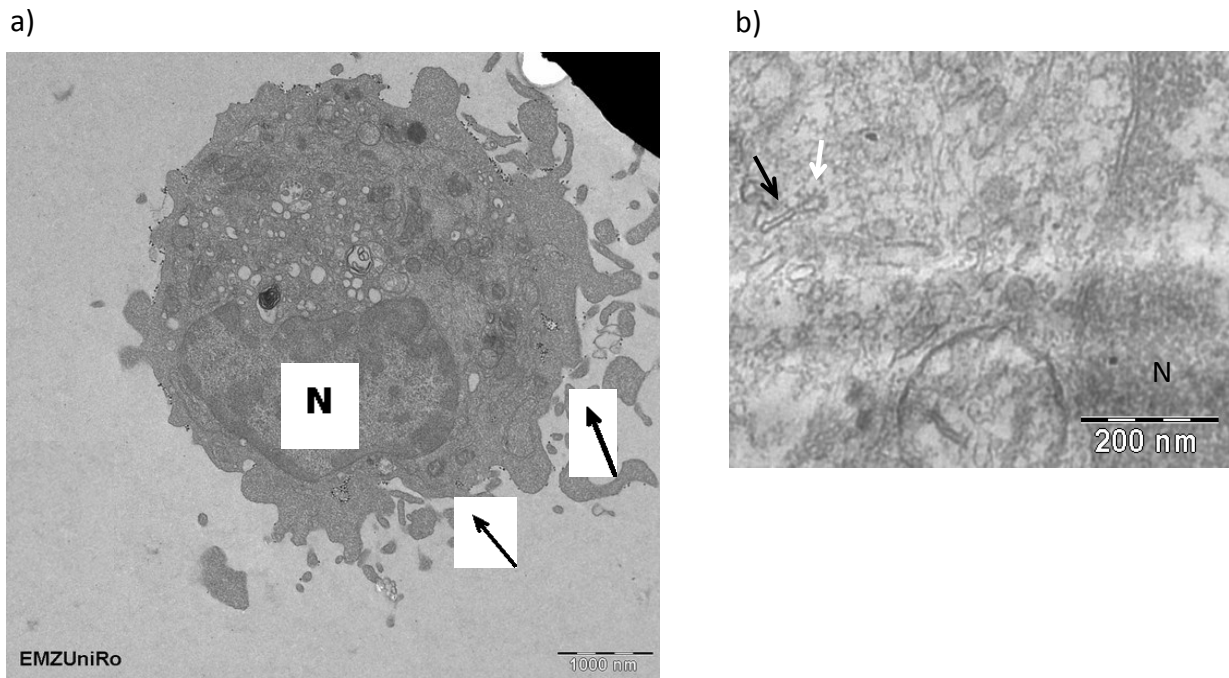


Abb. 8: Elektronenmikroskopisches Bild einer Langerhans-Zelle

In Abb. 8 a) sind die für LZ charakteristischen dendritischen Zellfortsätze (schwarzer Pfeil) dargestellt. Auf der Zelloberfläche sowie im Zytoplasma sind zudem die zur Isolierung genutzten MicroBeads zu sehen. Abb. 8 b) zeigt die für LZ typischen Birbeck Granula (schwarzer Pfeil) mit Coated Buds (weißer Pfeil). N = Nucleus.

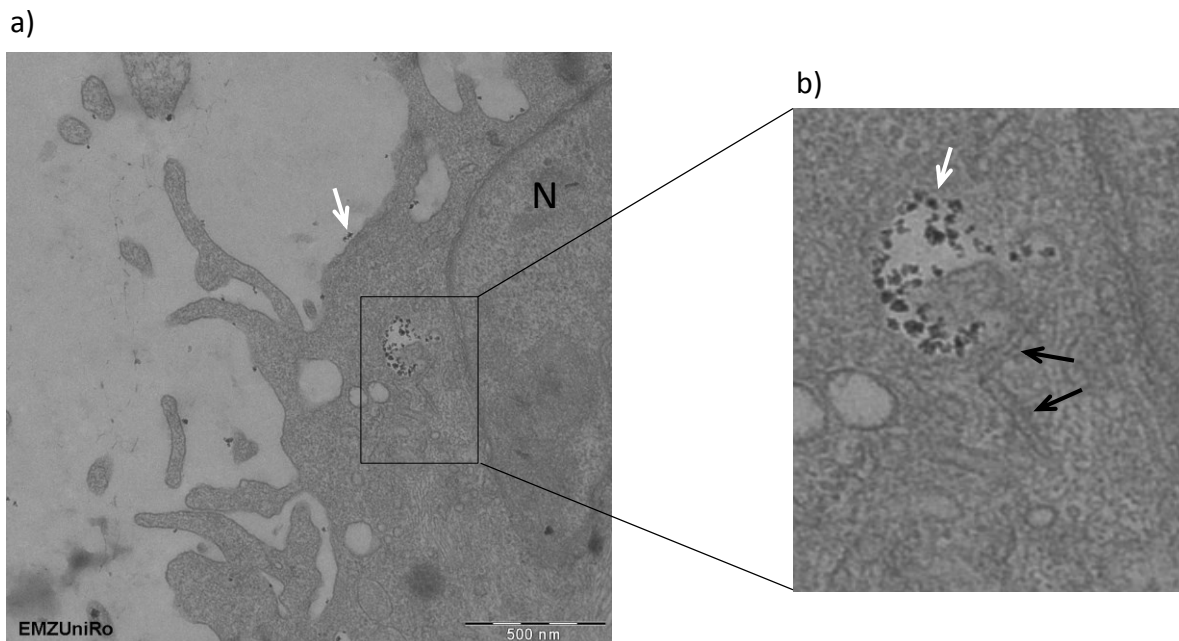


Abb. 9: Elektronenmikroskopische Darstellung der Birbeck Granula

Dargestellt ist eine LZ (a) mit denen für sie charakteristischen Birbeck Granula (b). N = Nucleus, schwarzer Pfeil = Birbeck Granula, weißer Pfeil = MicroBeads.

4.5. Zellzahl der Transplantate

Vor jeder Knochenmarktransplantation erfolgte im Vorfeld eine Bestimmung der zellulären Zusammensetzung des Transplantats. Die transplantierte mediane totale nukleäre Zellzahl (TNC) lag bei $3,7 \times 10^8/\text{kg}$ (Spannweite: $1,9\text{--}11,8 \times 10^8/\text{kg}$). Die medianen Zellzahlen der CD34⁺, CD14⁺ sowie CD3⁺ Zellen lag bei jeweils $6,7 \times 10^6/\text{kg}$ (Spannweite: $2,6\text{--}18,2 \times 10^6/\text{kg}$), $2,3 \times 10^7/\text{kg}$ (Spannweite: $0,7\text{--}7,3 \times 10^7/\text{kg}$) sowie $2,0 \times 10^7/\text{kg}$ (Spannweite: $0,9\text{--}7,9 \times 10^7/\text{kg}$), so dass insgesamt Transplantate mit mittleren bis hohen Stammzellzahlen generiert wurden. Eine Zusammenfassung der transplantierten TNC, CD34⁺, CD14⁺ sowie CD3⁺ Zellen ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6: Zellzusammensetzung der Transplantate.

Hunde	TNC		CD34		CD14		CD3	
	absolut [x 10 ⁸]	pro kg [x 10 ⁸]	absolut [x 10 ⁷]	pro kg [x 10 ⁶]	absolut [x 10 ⁷]	pro kg [x 10 ⁷]	absolut [x 10 ⁷]	pro kg [x 10 ⁷]
1	36,9	2,7	5,4	4,0	9,4	0,7	12,0	0,9
2	62,8	6,4	13,4	13,7	41,2	4,2	35,9	3,7
3	52,0	3,7	11,4	8,2	39,6	2,8	28,7	2,0
4	23,9	1,9	4,5	3,6	14,1	1,1	22,5	1,8
5	131,7	11,8	11,6	10,3	81,2	7,3	88,6	7,9
6	76,1	6,2	22,2	18,2	28,2	2,3	41,5	3,4
7	95,3	7,6	8,5	6,7	55,3	4,4	44,6	3,5
8	27,5	2,2	3,3	2,6	19,0	1,5	14,0	1,1
9	45,8	3,1	4,4	3,0	23,3	1,6	26,9	1,8
Median	52,0	3,7	8,5	6,7	28,2	2,3	28,7	2,0

4.6. Wiederherstellung der Zellularität im peripheren Blut

Nach erfolgter Knochenmarktransplantation kommt es bedingt durch das Konditionierungsregime zu einer Störung der Hämatopoese mit Leuko- sowie Thrombozytopenien und einem Abfall des Hämoglobinwertes. Das Ausmaß dieser gestörten Hämatopoese wird durch mehrfache Blutabnahmen nach Transplantation kontrolliert, da erniedrigte Leukozyten- sowie Thrombozytenwerte mit einem erhöhten Risiko für Infektionen sowie Blutungen einhergehen.

Der mediane Ausgangswert der Leukozyten lag bei $10,5 \times 10^9/\text{l}$ (Spannweite: $7,0\text{--}12,1 \times 10^9/\text{l}$). Der mediane Nadir der Leukozyten nach durchgeführter HSZT lag bei $1,5 \times 10^9/\text{l}$ (Spannweite: $0,7\text{--}2,3 \times 10^9/\text{l}$) und wurde im Median an Tag acht (Spannweite: Tag +6-11) erreicht. Bei zwei der neun transplantierten Tiere war ein Abfall unter die kritische Grenze von $1,0 \times 10^9/\text{l}$ an Tag sieben (Hund 2)

sowie Tag acht (Hund 7) zu verzeichnen. Die Leukozyten dieser beiden Hunde regenerierten jeweils an Tag neun (Abb. 10).

Der mediane Ausgangswert der Thrombozyten lag bei $312 \times 10^9/l$ (Spannweite $211\text{--}419 \times 10^9/l$). Der mediane Nadir der Thrombozyten betrug $0 \times 10^9/l$ (Spannweite: $0\text{--}19 \times 10^9/l$). Der mediane Zeitpunkt des Auftretens des Nadirs lag bei Tag +11 (Spannweite: Tag +10–14). Die Thrombozyten der drei Hunde, die keine Transfusion erhielten, regenerierten im Median an Tag +13 (Spannweite: Tag +12–21). Die übrigen sechs Tiere mit erfolgter Transfusion (mindestens eine Transfusion von Vollblut) regenerierten im Median an Tag +24 (Spannweite: Tag +19–40) (Abb. 11).

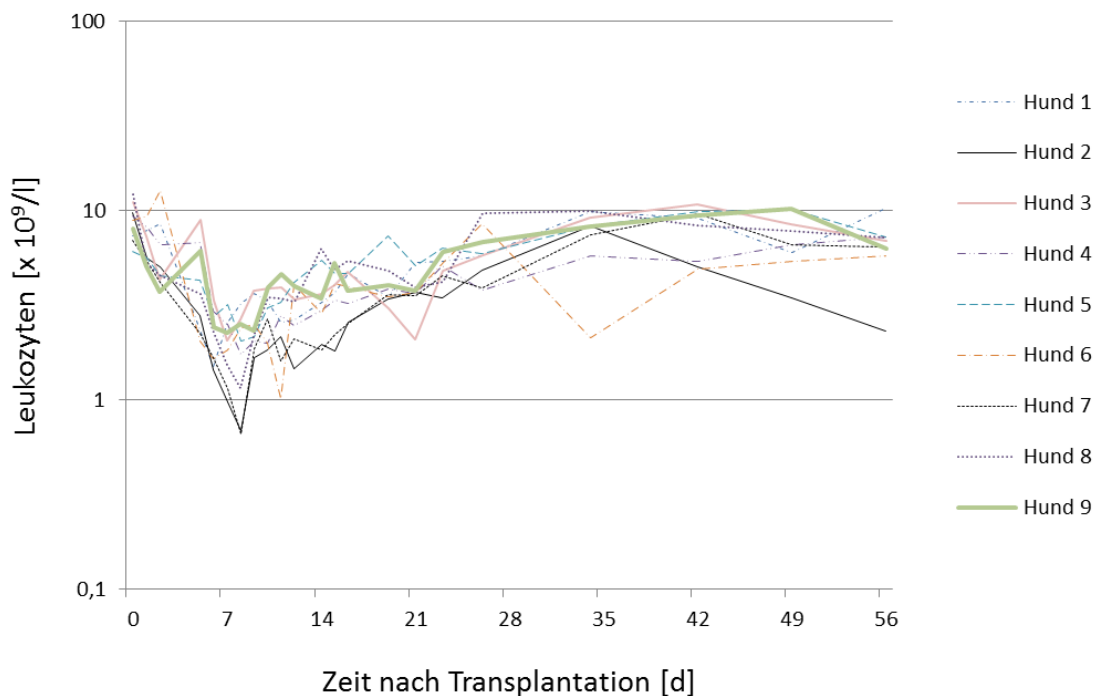


Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Leukozytenregeneration nach der Transplantation

Dargestellt sind die Verläufe der Leukozytenzahlen nach erfolgter HSZT mit reduzierter Konditionierung. Der mediane Nadir von $1,5 \times 10^9/l$ Leukozyten wurde im Median an Tag +8 erreicht. Zwei Tieren zeigten einen Abfall der Leukozyten unter die kritische Grenze von $1,0 \times 10^9/l$ an Tag +7 (Hund 2) sowie Tag +8 (Hund 7). Die Regenerationszeit der Leukozyten dieser beiden Tiere lag bei 9 Tagen.

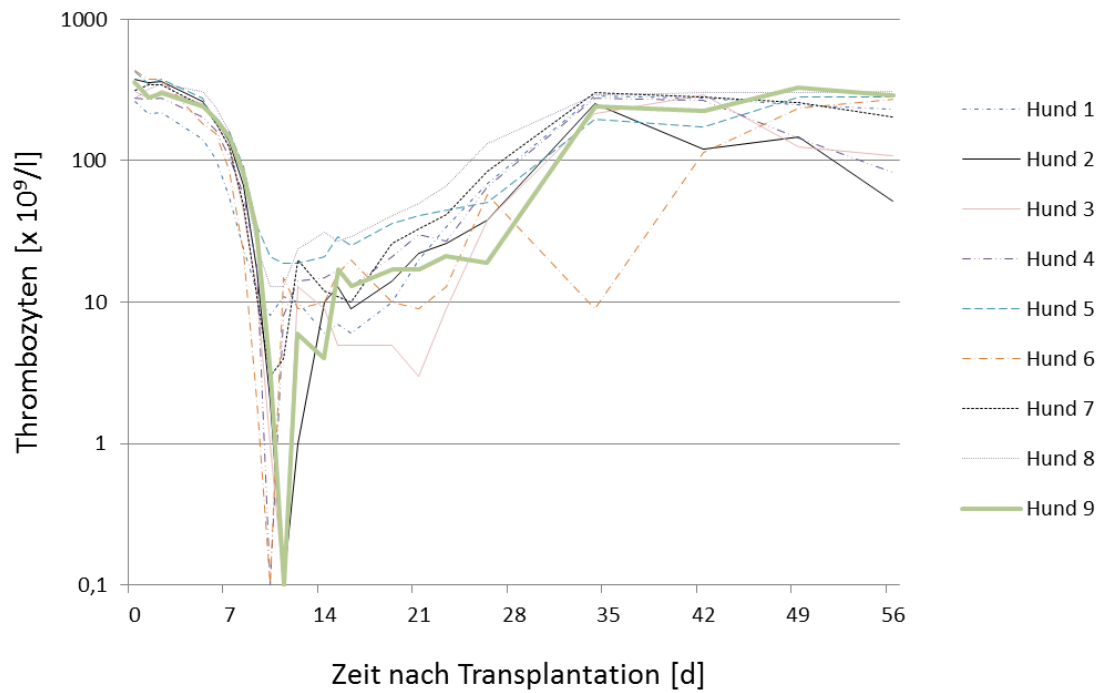


Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenregeneration nach der Transplantation

Dargestellt sind die Verläufe der Thrombozytenzahlen nach erfolgter HSZT mit reduzierter Konditionierung. Der mediane Nadir von $0 \times 10^9/l$ wurde im Median an Tag +11 erreicht. Die mediane Regenerationszeit der Thrombozyten lag bei 13 Tagen (Tiere ohne Transfusion von Vollblut) bzw. 24 Tagen (Tiere mit Transfusion von Vollblut).

4.7. Chimärismusanalyse

Die Analyse des Spenderchimärismus der Granulozyten, PBMZ sowie der LZ erfolgte jeweils vor der Transplantation sowie im Anschluss an die Transplantation an den Tagen +28, +56, +105. Tiere, bei denen bis Tag +105 ein Spenderchimärismus in den Blutzellen nachgewiesen werden konnte, wurden zudem in weiteren definierten Zeiträumen (d +140–299, d +300–400, d > +400) untersucht.

4.7.1. Entwicklung des Spenderchimärismus im Blut

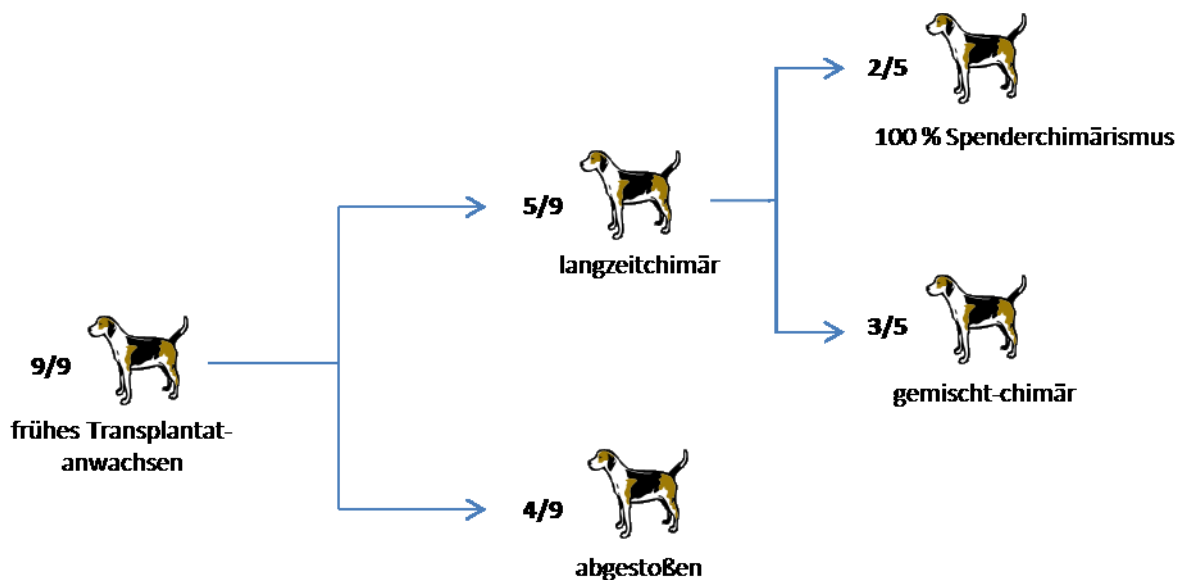


Abb. 12: Entwicklung des Spenderchimärismus im Blut

Dargestellt ist die Entwicklung des Spenderchimärismus im Transplantationsverlauf. Es wurden sowohl der Chimärismus im Kompartiment der Granulozyten als auch im Kompartiment der PBMZ bestimmt. Nur wenn in beiden Kompartimenten ein Spenderchimärismus nachweisbar war, wurde der Hund als „angewachsen“ eingruppiert. Konnten im Verlauf in beiden Kompartimenten keine Spenderzellen mehr nachgewiesen werden, wurde das Transplantat als „abgestoßen“ eingruppiert.

Bei allen Hunden kam es zu einem initialen Transplantat-Anwachsen. Bereits an Tag +14 ließ sich sowohl in den Granulozyten als auch in den PBMZ aller Tiere ein Spenderchimärismus nachweisen. An diesem Tag lag der mediane Spenderanteil der Granulozyten bei 34 % (Spannweite: 12-90 %) und der mediane Spenderanteil der PBMZ bei 16 % (Spannweite: 5-43 %). Bei drei Versuchstieren kam es im

Verlauf jedoch zu einer Transplantatabstoßung an den Tagen +70 (Hund 1, 8) sowie +91 (Hund 9) nach Transplantation. Ein Tier verstarb an Tag +60 nach HSZT, so dass keine weitere Beobachtung der Chimärismusentwicklung möglich war. Nachdem jedoch auch hier frühzeitig ein Transplantat-Anwachsen zu verzeichnen war, zeigte sich bis Tag +56 ein Abfall der Spenderzellen im Blut.

In den Granulozyten sowie PBMZ von fünf Tieren konnte unter dem gewählten nicht-myeloablativen Konditionierungsregime ein Langzeitchimärismus (\geq Tag +180) nachgewiesen werden. Die Hunde drei und vier entwickelten einen kompletten Spenderchimärismus an den Tagen +91 sowie +77. Die übrigen drei Hunde (Hund 5, 6, 7) wiesen einen gemischten Chimärismus auf. Ein Hund (Hund 6) mit nachgewiesenem gemischtem Langzeitchimärismus zeigte im Verlauf der Post-Transplantationsphase eine Transplantatabstoßung an Tag +391. Ein weiterer Hund fiel in der späten Post-Transplantationsphase im Spenderanteil der peripheren Blutzellen ab, ohne jedoch eine komplette Transplantatabstoßung bis Tag +486 (letzter Beobachtungszeitpunkt) zu zeigen. So lag der Spenderanteil in den Granulozyten an diesem Tag noch bei 18 % sowie 12 % in den PBMZ.

Die einzelnen Chimärismusdaten der Granulozyten und PBMZ sind in Tabelle 7 aufgeführt.

4.7.2. Chimärismus der Langerhans-Zellen

Insgesamt konnten in sechs von neun Hunden (Hunde 2-7) LZ vom Spender nachgewiesen werden. Für die anderen drei Tiere (Hunde 1, 8, 9) konnte zu keiner Zeit ein Spenderchimärismus in den LZ detektiert werden. Bei zwei Tieren (Hund 5, 8) wurde vor erfolgter HSZT ein Wert für den Spenderanteil gemessen. Bei einem der Tiere (Hund 8) blieb dieser Wert im Verlauf relativ konstant. Somit wurden bei diesem Tier im gesamten Untersuchungszeitraum keine LZ vom Spender nachgewiesen. Der andere Hund (Hund 5) wies im Verlauf einen deutlichen Anstieg der Messwerte auf, so dass dies als Anstieg des Spenderchimärismus gewertet wurde.

Den frühesten Zeitpunkt, an dem ein Spenderchimärismus in den LZ zu verzeichnen war, bildete Tag +56 nach HSZT. Zu diesem Zeitpunkt konnte bei fünf Tieren ein medianer Chimärismus von 6 % (Spannweite: 2–42 %) nachgewiesen werden. Ein Tier (Hund 6) zeigte erstmals an Tag +112 nach HSZT LZ vom Spendertyp. Im weiteren Post-Transplantationsverlauf konnte fortwährend (bei insgesamt fünf Tieren - ein Hund verstarb an Tag +60 nach HSZT) ein Anstieg des Spenderanteils in den LZ beobachtet werden. In dem beobachteten Zeitraum konnte ein maximaler Anstieg des Spenderanteils von 96 % (Hund 4) an Tag +483 nachgewiesen werden. Im Median lag der Spenderchimärismus der LZ an Tag > +400 nach HSZT bei 85 %.

Die einzelnen Chimärismusdaten der Langerhans-Zellen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

4.7.3. Vergleich Chimärismus der Langerhans-Zellen vs. PBMZ/Granulozyten

Die Hunde, die bereits eine frühe Transplantatabstoßung (bis Tag +91) im Blut zeigten, wiesen zu keiner Zeit einen Spenderchimärismus in den LZ auf (Abb. 13 B). Bei allen Tieren, die in den Granulozyten sowie PBMZ einen Langzeitchimärismus ausbildeten (\geq d +180 nach HSZT), konnte im Verlauf auch ein Spenderanteil in den LZ detektiert werden. Während bereits an Tag +14 durchgehend bei allen Hunden sowohl in den Granulozyten als auch PBMZ ein Spenderanteil zu beobachten war, lag dieser am Tag +28 in den LZ im Median noch bei 0 %. Erst am Tag +56 konnte erstmalig ein Chimärismus in den LZ beobachtet werden (Hund 2-5, 7). Insgesamt verlief die Entwicklung des Spenderanteils in den LZ im Vergleich zu den Blutzellen signifikant langsamer (Tag +28 sowie 56: LZ vs. PBMZ: $p < 0,05$; LZ vs. Granulozyten: $p < 0,05$) (Abb. 13 A). Die Tiere, die einen vollen Spendercharakter im Blut entwickelten (Hund 3, 4), zeigten in der Post-Transplantationsphase den stärksten Anstieg des Spenderanteils in den LZ verglichen mit gemischt-chimären Hunden mit nachgewiesenem Langzeitchimärismus (Hund 5, 6, 7) (Median Tag $> +400$: 92 % vs. 59 %). Trotz eines vollen Spendercharakters in den Blutzellen bereits an Tag +91 (Hund 3) und Tag +77 (Hund 4) bei zwei Tieren, entwickelte keines der beiden auch ein Jahr nach Transplantation (Tag +609 bzw. +483) einen 100% igen Spenderanteil in den LZ. Ein Hund (Hund 6) mit initial gemischtem Langzeitchimärismus im Blut und im Verlauf dann kompletter Abstoßung der PBMZ sowie Granulozyten vom Spender (PBMZ 0 % an Tag +391, Granulozyten 0 % an Tag +140) in der späten Post-Transplantationsphase, zeigte dennoch einen weiteren Anstieg des Spenderanteils in den LZ über den Zeitpunkt der Abstoßung des Spenders im Blut hinaus (Abb. 13 C). Ein zweites Tier (Hund 7), bei dem ebenfalls ein Abfall des Spenderanteils in den Blutzellen zu verzeichnen war, ohne dass jedoch in dem von uns untersuchten Zeitraum (bis Tag +486) eine komplette Abstoßung im Blut beobachtet werden konnte, zeigte ebenfalls fortwährend einen Anstieg im Spenderanteil der LZ.

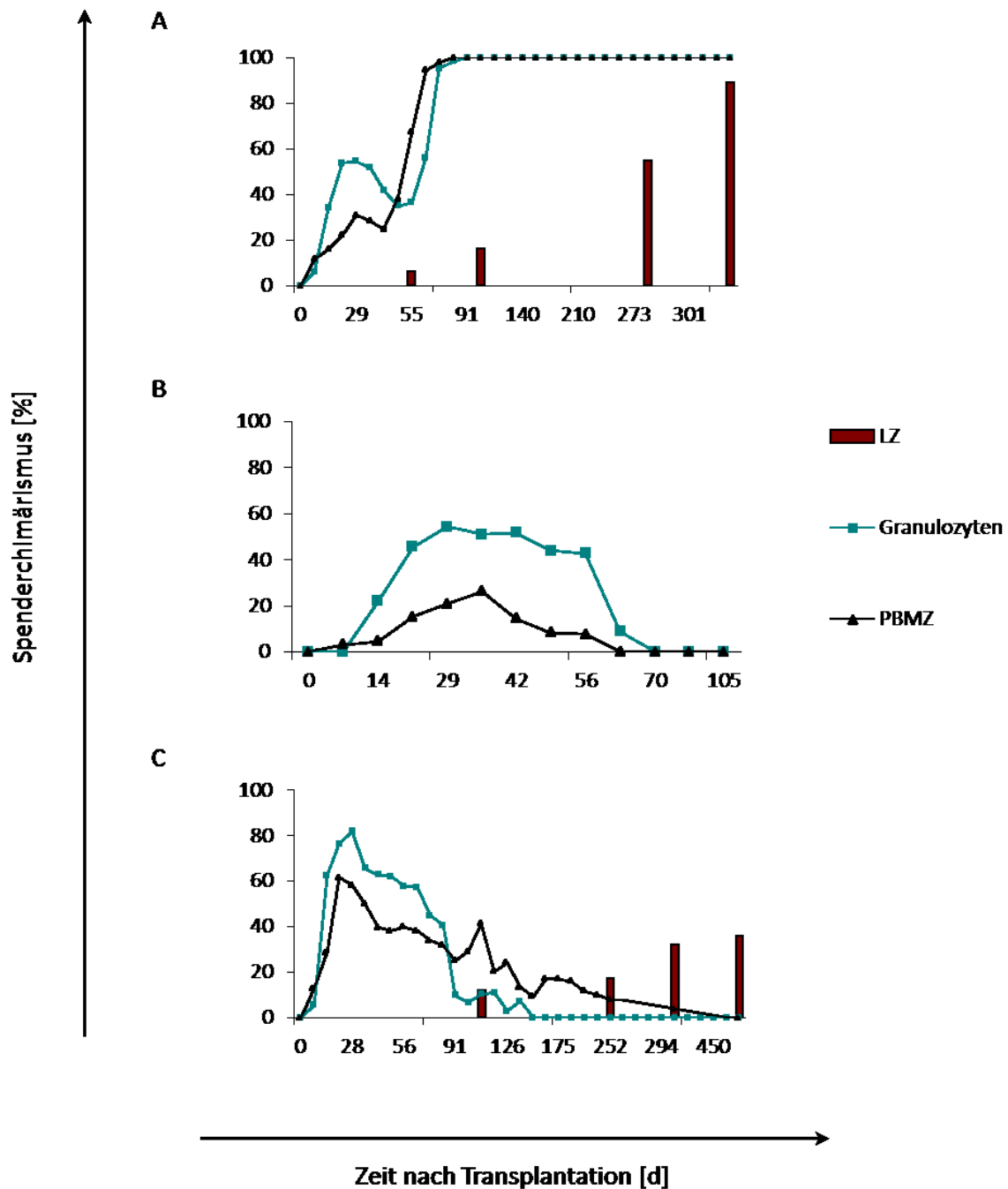


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf des Chimärismus der LZ im Vergleich zum Chimärismus der Granulozyten und PBMZ Kompartimente

Beispielhafte Darstellung der drei beobachteten zeitlichen Verläufe des LZ-Chimärismus vom Spender verglichen mit dem Spenderchimerismus der Granulozyten und PBMZ. (A) Hunde mit nachgewiesenem Langzeitchimärismus (\geq d +180) in den Blutzellen zeigten zeitlich verzögert auch einen Anstieg des Spenderchimerismus in den LZ. (B) Bei früher Transplantatabstoßung (vor Tag +105) konnte zu keiner Zeit ein Spenderanteil in den LZ nachgewiesen werden. (C) Eine späte Transplantatabstoßung in den Blutzellen am Tag +391 resultierte dennoch in einen fortwährenden Anstieg des Spenderanteils in den LZ.

Tab. 7: Spenderchimärismus der Granulozyten, PBMZ sowie Langerhans-Zellen in der Post-Transplantationsphase (Angaben in %)

Zelltyp	Zeit nach HSZT (d)	Hunde									Median
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Granulozyten	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
	+28	51	90	54	41	96	82	100	24	33	54
	+56	43	28	37	50	96	58	77	4	6	43
	+105	0	†	100	100	95	10	100	6	0	53
	+140-299	-	†	100	100	-	0	23	0	0	11
	+300-400	-	†	-	-	100	0	30	0	-	15
	> +400	-	†	100	100	97	0	18	-	-	97
PBMZ	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0
	+28	26	41	31	18	32	58	26	15	14	26
	+56	8	36	67	64	50	40	21	3	11	36
	+105	0	†	100	100	64	41	92	5	0	53
	+140-299	-	†	100	100	-	8	25	0	0	17
	+300-400	-	†	-	-	69	4	18	0	-	11
	> +400	-	†	100	100	80	0	12	-	-	80
LZ	0	0	0	0	0	3	0	0	7	0	0
	+28	0	0	0	0	2	0	0	7	0	0*
	+56	0	2	6	42	16	0	2	7	0	2**
	+105	0	†	17	89	14	12 [▲]	4	5	0	9
	+140-299	-	†	55	90	-	17	6	8	0	13
	+300-400	-	†	-	-	40	32	23	5	-	27
	> +400	-	†	89	96	81	36	n.d.	-	-	85

* $p < 0,05$ (LZ vs. Granulozyten; LZ vs. PBMZ an d +28); ** $p < 0,05$ (LZ vs. Granulozyten; LZ vs. PBMZ an d +56)

† Hund verstarb an Tag +60 nach HSZT; Hund 8 zeigte bereits erstmalig an Tag +70 0 % Spenderanteil in den Granulozyten sowie PBMZ; n.d. - nicht definiert (zu geringe DNA-Menge); [▲] Probenentnahme erfolgte an d +112

4.8. Toxische Komplikationen und Graft-versus-Host-Disease

Insgesamt wurde die Therapie unter dem gewählten Konditionierungsregime bei sieben von neun Hunden gut vertragen ohne Auftreten einer höhergradigen Organtoxizität (Junghanss et al., 2012). Ein Hund verstarb an Tag +60 nach HSZT an einer Pneumonie. Bei diesem Tier bestand eine Geschlechtsdifferenz zwischen Spender und Empfänger. Zum Zeitpunkt des Todes lag ein gemischter Chimärismus vor. Ein Tier zeigte beginnend an Tag +96 nach Transplantation eine akute GvHD der Haut (mit Exanthem und stellenweise Haarausfall) sowie des Magen-Darm-Traktes mit Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe, welche mit peroralen Kortikoiden (Prednisolon über einen Monat) gut beherrscht war. Dennoch verstarb auch dieser Hund plötzlich an Tag +503 nach Transplantation, obgleich sich unter der genannten Therapie zunächst eine deutliche Besserung zeigte. Die spätere Obduktion ergab auch hier als Ursache eine Pneumonie. Dieser Hund bildete einen kompletten Spenderchimärismus im Blut aus und zeigte auch einen stetigen Anstieg des Anteils der Langerhans-Zellen vom Spender in der Haut.

5. Diskussion

Die Graft-versus-Host-Erkrankung ist fortbestehend die führende Ursache der hohen Mortalität und Morbidität sowohl nach myeloablativer als auch nach nicht-myeloablativer Stammzelltransplantation. Hierbei stellt die Haut das meist betroffene Organ dar.⁷⁷ Durch vorangegangene Studien über die Pathomechanismen der Entwicklung der GvHD wurde bereits postuliert, dass bei der Ausbildung der akuten GvHD das Persistieren von Empfängerzellen nach Transplantation eine entscheidende Rolle spielt.^{78,79} Speziell für die akute GvHD der Haut konnte in einer Studie von Merad et al. (2004) gezeigt werden, dass das Verbleiben von LZ vom Empfänger in der Haut nach einer Stammzelltransplantation eine Ursache für das Auftreten der akuten GvHD der Haut ist.⁷⁴ Hierzu wurden Mäusen nach Knochenmarkstransplantation T-Zellen vom Spender injiziert. Dabei fand man heraus, dass nur die Mäuse eine akute GvHD der Haut entwickelten, die noch Empfänger-LZ besaßen, während Mäuse mit vollem Spendercharakter in den LZ keine akute GvHD ausbildeten.⁷⁴ Dem scheinbar entgegen steht eine erst jüngere Studie von Hongmei Li et al. (2011), in der publiziert wird, dass die Anwesenheit von LZ keine Voraussetzung für die Ausbildung einer GvHD ist, so lange andere Antigen präsentierende Zellen intakt sind.⁸⁰ In dieser Studie wurden LZ-defizienten Mäusen T-Zell-depletiertes Knochenmark mit angereicherten CD8⁺- bzw. CD4⁺-Zellen transplantiert nach initialer TBI. Trotz der Abwesenheit von Empfänger-LZ kam es zur Ausbildung einer akuten GvHD der Haut. Auch bildete sich diese aus, wenn es sich sowohl bei den Empfängern als auch Spendern um LZ-depletierte Mäusen handelte.⁸⁰ Diese Studie spricht sich jedoch lediglich gegen die Notwendigkeit von LZ in der Induzierung der akuten GvHD der Haut aus, erlaubt letztlich aber keine Aussage darüber, dass LZ dennoch eine akute GvHD auslösen sowie in Schwere und Verlauf beeinflussen können.

Es wurden bereits einige wenige Studien über die Entwicklung des LZ-Chimärismus nach myeloablativer Transplantation mit Ganzkörperbestrahlung publiziert.^{75,81} Die Entwicklung des Chimärismus in den LZ nach nicht-myeloablativer Transplantation ist jedoch weitgehend unerforscht, obgleich es in der Vergangenheit zu einer zunehmenden Anzahl an Transplantationen mit Konditionierungsregimen mit reduzierter Intensität kam. Dass es hierunter zu einer Veränderung der Kinetik in der Chimärismusedwicklung zwischen Empfänger- und Spender-Zellen kommt, ließen bereits Studien vermuten, in denen gezeigt wurde, dass es zu Veränderungen im zeitlichen Auftreten der akuten sowie chronischen GvHD nach nicht-myeloablativer Transplantation kam.^{29,31} Unter anderem zeigte sich ein verzögertes Auftreten der akuten GvHD der Haut nach nicht-myeloablativer Knochenmarkstransplantation.²⁹ Unter der Annahme, dass LZ vom Empfänger an der Ausbildung der akuten GvHD der Haut beteiligt sind, wäre demnach auch ein längeres Persistieren dieser nach Knochenmarkstransplantation mit reduzierter Konditionierung zu erwarten. Daher untersuchten wir in unserer Studie den Chimärismus von LZ nach nicht-myeloablativer Knochenmarkstransplantation an

einem Hundemodell. Die Hunde wurden zur Konditionierung einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy ausgesetzt. Nach anschließender Knochenmarktransplantation von DLA-identen Geschwistertieren erhielten die Tiere eine nachfolgende Immunsuppression bestehend aus Cyclosporin A und Everolimus.

5.1. Entwicklung der Langerhans-Zell-Zahlen

Bisherige Studien haben gezeigt, dass es nach allogener HSZT zunächst zu einem Abfall der LZ-Zahl kommt.^{82,83} Das Ausmaß und der zeitliche Verlauf des Zellzahlabfalls sind in der Literatur unterschiedlich beschrieben und hängen unter anderem von den untersuchten Spezies bzw. deren Grunderkrankung, welche zur Transplantation geführt hat, ab. So zeigte sich bei Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen wie Leukämien oder aplastischer Anämie bereits vor Transplantation eine erniedrigte LZ-Zahl verglichen zur gesunden Kontrollgruppe.⁸² Auch gibt es Unterschiede im Erreichen des Nadirs der LZ-Zahl nach myeloablativer Transplantation. Perreault et al. (1984) konnten in einer Studie an Patienten mit akuter Leukämie, chronisch myeloischer Leukämie und aplastischer Anämie zeigen, dass der Nadir der LZ-Zahlen nach myeloablativer Knochenmarktransplantation an Tag +11 auftrat.⁸² In den Untersuchungen von Volc-Platzer et al. (1988) an Patienten, welche ebenfalls an aplastischer Anämie, akuter myeloischer Leukämie oder chronisch myeloischer Leukämie erkrankt waren, zeigt sich der Nadir der Langerhans-Zellen nach myeloablativer Knochenmarktransplantation erst zwischen der 3.-4. Woche.⁸³ Anschließend wird in beiden Studien ein fortwährender Anstieg der LZ-Zahl beschrieben, bis schließlich nach 3-12 Monaten wieder die Ausgangswerte erreicht werden.

Wir untersuchten die LZ-Zahl am Tag vor der Transplantation sowie an verschiedenen Zeiten nach nicht-myeloablativer Knochenmarktransplantation. Insgesamt lag der prozentuale Anteil der LZ an der Gesamt-Zellzahl der Epidermis bei 2,7 %. Dies deckt sich mit den Angaben in der Literatur, in der Werte von insgesamt 3 % LZ-Anteil an der Epidermis beschrieben sind.⁵⁸ Aus 101 mm² Hautbiopsat gewannen wir vor der Transplantation im Median 3×10^4 LZ bis hin zu $6,4 \times 10^4$ Zellen weit nach der Transplantation (> Tag +400). Dies entspricht auch den in der Literatur publizierten LZ-Zahlen bezogen auf ~ 100 mm² große Hautareale, wobei die Werte hier zwischen $2,6\text{--}6,5 \times 10^4$ Zellen schwanken.^{75,82} Die durch uns angewandte Methodik ist somit vergleichbar gut geeignet zur Untersuchung der LZ in der Haut wie die genutzten Methoden in anderen Studien, wie etwa der Immunfluoreszenzmikroskopie.^{82,75}

Auch in unseren Versuchen war ein schneller, im Vergleich zur Ausgangszellzahl signifikanter Abfall der LZ-Zahl bereits 28 Tage nach erfolgter Transplantation trotz niedrigdosierter Ganzkörperbestrahlung

mit 2 Gy zu verzeichnen. Anschließend sahen auch wir einen Wiederanstieg der LZ-Zahlen. Verglichen zur myeloablativen Transplantation kam es jedoch zu einem früheren Wiedererreichen der Ausgangswerte bereits an Tag +56. Auch kam es bei keinem der Tiere zu einem kompletten Verlust der LZ, was jedoch nach myeloablativer Transplantation durchaus zu beobachten war.⁸² Insgesamt kam es bezogen auf die Ausgangswerte vor Transplantation zu einem maximalen Abfall der LZ-Zahl von im Median 37 % unter dem von uns gewählten Konditionierungsregime. Die einzig bisher publizierte Studie zur LZ-Zahl-Entwicklung nach reduzierter Konditionierung von Collin et al. zeigte ebenfalls verglichen mit einem myeloablativen Therapieregime einen geringeren Abfall der LZ-Zahl an Tag 0 (Tag der Konditionierung) und ein schnelles Wiedererreichen des Ausgangswertes bis Tag +40 nach Transplantation.⁷⁵ Hier lag das Maximum des LZ-Zahl-Abfalls jedoch bei nur 9 %. In dieser Studie bestand das reduzierte Konditionierungsregime aus einer Kombination von Fludarabin und Melphalan +/- Alemtuzumab anstelle einer Bestrahlung, was den wesentlichen Unterschied zu unserem Konditionierungsregime ausmacht. Die Tatsache, dass die Hunde in unseren Untersuchungen einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy vor der Transplantation ausgesetzt wurden, könnte somit die Ursache für das stärkere Ausmaß der LZ-Depletion nach erfolgter Transplantation gewesen sein. Dies würde die Hypothese erlauben, dass das Ausmaß der LZ-Depletion vor allem durch die Bestrahlungsdosis beeinflusst wird, auch angesichts der Beobachtung, dass es unter Hochdosisbestrahlung zu dem stärksten Abfall bis hin zu einem kompletten Verlust der LZ kam.⁸²

Nicht hinreichend erklären lässt sich der im Verlauf in unseren Untersuchungen gezeigte erneute Abfall der LZ-Zellen bis Tag +105. Angesichts des im weiteren Verlauf kontinuierlichen Anstiegs der Zellzahl bis Tag > +400, gehen wir am ehesten von einer Messungenauigkeit aus bzw. wäre auch ein Zellverlust während der Aufbereitung zu diskutieren. Interessant ist, dass nach Tag +400 nach HSZT ein über die Ausgangszellzahl hinausgehender Anstieg der LZ-Zahl detektiert werden konnte. Zu dieser Beobachtung kam es bereits in einer früheren Studie von Volc-Platzer et al. (1988), in der ebenfalls höhere Zellzahlen nach myeloablativer Transplantation im Verlauf erreicht wurden.⁸³ Ursächlich hierfür könnte eine nach initialem Zellabfall reaktiv verstärkte Rekrutierung von LZ aus dem Knochenmark sein, deren genaue Pathomechanismen bisher nicht bekannt sind.

Des Weiteren wird in der Literatur eine Beeinflussung der Entwicklung der LZ-Zahl durch die Ausbildung einer akuten GvHD der Haut beschrieben, wohingegen die chronische GvHD nach myeloablativer Knochenmarktransplantation keinen Einfluss auf die Zellzahl zu haben scheint.⁸³ In der Haut von Patienten mit einer akuten GvHD nach myeloablativer Knochenmarktransplantation fanden sich in mehreren Studien signifikant weniger LZ als in der Haut gesunder Patienten.^{75,82,84,85} Auch kam es unter Ausbildung einer akuten GvHD zu einem verzögerten Wiederanstieg der Zellzahl sowohl nach nicht-myeloablativer als auch myeloablativer Knochenmarktransplantation.^{75,85} So zeigte sich bei Patienten ohne akuter GvHD eine Normalisierung der LZ-Zahl bereits an Tag +40, während bei

Patienten mit akuter GvHD auch an Tag +100 nach HSZT die Ausgangszellzahl noch nicht wieder erreicht war. Als mögliche Ursache wird hier zum einen die Tatsache diskutiert, dass im Falle einer GvHD ein hypoplastisches Mark nach Transplantation vorliegt, welches selbst ein Risikofaktor für die Ausbildung einer akuten GvHD ist und schließlich durch die verminderte Anzahl an verfügbaren Vorläuferzellen auch mit einem langsameren LZ-Zahl-Anstieg verbunden ist. Des Weiteren wird die Therapie mit Kortikoiden für den verzögerten Wiederanstieg verantwortlich gemacht.⁸² Und schließlich wurde bereits auch überlegt, ob die Empfänger-LZ selbst ein Zielorgan der akuten GvHD sind und somit im Falle des Auftretens einer akuten Haut-GvHD diese dementsprechend in ihrer Zahl vermindert sind. Dies würde die Vermutung bestärken, dass die LZ eine Rolle in der Ausbildung der akuten GvHD spielen. In unserer Studie erlitt einer von neun Hunden eine akute GvHD der Haut. Verglichen mit den anderen Tieren konnten wir jedoch keinen Unterschied bezüglich des zeitlichen Ablaufs bis zum Wiedererreichen normaler Zellzahlen feststellen. Interessanterweise zeigte dieser Hund jedoch im Verlauf den stärksten Anstieg der LZ-Zahl in dem Untersuchungszeitraum nach Tag +400, so dass es durch die entzündlichen Prozesse in der Haut unter der akuten GvHD scheinbar zu einer stärkeren Rekrutierung von LZ aus dem Knochenmark mit konsekutiven Anstieg der LZ-Zahl über die Ausgangswerte hinaus kam, der erst Monate nach Beginn der akuten GvHD zu verzeichnen war. Diese Erkenntnis deckt sich mit Untersuchungen, in denen man ebenfalls in entzündlicher Haut (z.B. Gingivitis, Periodontitis, Aphthen-Stomatitis, Kontaktdermatitis) verglichen mit gesunder Haut eine höhere Anzahl von LZ finden konnte.⁵⁸

5.2. Zellregeneration im peripheren Blut

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Gefahr einer Infektion im Zusammenhang mit der Neutropeniedauer nach Stammzelltransplantation steht. Die Geschwindigkeit der Wiederherstellung der Zellularität im peripheren Blut ist somit entscheidend für den Therapieverlauf. In der Studie von Gil et al. (2007) zeigte sich nach autologer Stammzelltransplantation nach konventionellem Therapieregime ein signifikanter Zusammenhang zwischen Neutropeniedauer und Infektionsrate. Das höchste Infektionsrisiko hatten Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie sowie akuter myeloischer Leukämie, und von diesen Patienten vor allem diejenigen, deren Therapieregime eine Ganzkörperbestrahlung mit einschloss.⁸⁶ Dies lässt darauf schließen, dass das Therapieregime selbst und hier vor allem die TBI einen entscheidenden Faktor für das Ausmaß und die Dauer der Neutropeniephase darstellen. Einen weiteren Einflussfaktor stellt die Quelle der Stammzellen dar, die zur Transplantation genutzt werden. So konnten bisherige Studien zeigen, dass es nach Transplantation von peripheren Stammzellen anstelle von Knochenmark zu einem schnelleren

Transplantatanwachsen kommt, was wiederum die Gefahr für Infektionen reduziert. In den Untersuchungen von Gahrton et al. (2007) konnte gezeigt werden, dass es sowohl nach konventionellem Therapieregime als auch nach HSZT mit reduzierter Konditionierung zu einem schnelleren Transplantatanwachsen kommt, wenn periphere Blutstammzellen im Vergleich zu Knochenmark transplantiert werden.⁸⁷ In der Studie von Sorror et al. (2004) zeigte sich zudem ein Unterschied im zeitlichen Anwachsen des Transplantats sowie der hämatopoetischen Toxizität bedingt durch das gewählte Konditionierungsregime. So kam es nach myeloablativer HSZT zu einem signifikant häufigeren Auftreten einer höhergradigen hämatopoetischen Toxizität verglichen zu reduzierten Konditionierungsregimen. Auch konnte nach myeloablativer HSZT ein verzögerter Wiederanstieg sowohl der neutrophilen Granulozyten als auch der Thrombozyten im Blut beobachtet werden.²⁶ Ähnliche Ergebnisse ergaben die Untersuchungen von Martino et al. (2006), die ebenfalls einen verzögerten Wiederanstieg sowohl der neutrophilen Granulozyten als auch der Thrombozyten nach myeloablativer HSZT verglichen zu nicht-myeloablativer Transplantation nachweisen konnten.⁸⁸ In unseren Untersuchungen wurde als Stammzellquelle Knochenmark verwandt. Unter dem gewählten nicht-myeloablativen Therapieregime mit einer TBI mit 2 Gy und einer anschließenden Immunsuppression bestehend aus Everolimus in Kombination mit Cyclosporin A kam es bei zwei von neun Hunden zu einem Abfall der Leukozyten unter die kritische Grenze von $1,0 \times 10^9/\text{l}$. Die Tatsache, dass die übrigen sieben Tiere keine Leukopenie ausbildeten, bestätigt letztlich die geringere Toxizität des von uns angewandten Therapieregimes und deckt sich somit mit den Ergebnissen der bisherigen Untersuchungen über die hämatopoetische Toxizität der RIC. Im Vergleich zu den Studien von Sorror et al. und Martino et al. zeigt sich zudem eine kürzere Regenerationszeit zumindest der Leukozytenzahlen unter dem von uns gewählten nicht-myeloablativen Therapieregime.^{26,88} Letztlich haben unsere Ergebnisse jedoch auf Grund der geringen Anzahl an Versuchstieren nur hinweisenden Charakter. Um allgemeingültige Rückschlüsse ziehen zu können, wären weitere Studien mit einem höheren Kollektiv an Versuchstieren notwendig. Bezüglich der Regenerationszeit der Thrombozytenzahlen zeigte sich eine Verzögerung im Vergleich zu anderen Studien. So regenerierten die Thrombozyten bei den Hunden, die keine Transfusion erhielten im Median an Tag +13 bzw. bei den Tieren, die mindestens eine Transfusion erhielten, an Tag +24. Letztlich wurde die Thrombozytopenie bereits in früheren Studien als Nebenwirkung unter der Therapie mit Everolimus beschrieben^{89,90,91}, so dass die Anwendung dieses mTOR-Inhibitors am ehesten verantwortlich für die verzögerte Regenerationszeit der Thrombozyten unter dem von uns gewählten Therapieregime ist. In einer retrospektiven Studie von Ramirez et al. (2011) an insgesamt 850 Patienten konnte gezeigt werden, dass eine verzögerte Regeneration der Thrombozytenzahlen mit einer signifikant höheren therapiebedingten Sterblichkeit sowie einem verminderten Gesamtüberleben verbunden ist.⁹² Jedoch beziehen sich diese Daten auf das Ausbleiben einer Regeneration der Thrombozyten bis nach Tag +60

nach Transplantation. In unseren Untersuchungen lag die Regenerationszeit der Thrombozyten jedoch bei allen Tieren unter 60 Tagen (spätestens bei 40 Tagen), so dass anhand der aktuellen Datenlage nicht davon auszugehen ist, dass das Ausmaß der Verzögerung der Thrombozyten-Regenerationszeit unter Everolimus zu einer erhöhten therapiebedingten Sterblichkeit bzw. vermindertem Gesamtüberleben führt, zumal es bei keinem der Tiere zu transfusionspflichtigen Blutungskomplikationen kam.

5.3. Transplantatanwachsen nach nicht-myeloablativer Konditionierung

Um optimale Voraussetzungen für ein Transplantatanwachsen zu schaffen, erfolgte in unserer Studie die allogene Knochenmarkstransplantation zwischen MHC-identen Geschwisterpaaren. Beim Menschen umfasst der MHC-Komplex den Genkomplex des humanen Leukozytenantigens (HLA-Systeme). Dass die Übereinstimmung im MHC-Komplex zwischen Spender und Empfänger beim Menschen einen großen Einfluss sowohl auf das spätere Transplantatanwachsen, auf die Ausbildung von Rezidiven als auch auf das Auftreten der GvHD hat, konnte bereits in vielen Studien gezeigt werden.^{93,94,95,96} Anfang der 70er Jahre konnte schließlich durch Untersuchungen von Templeton et al. ein caniner MHC-Komplex (DLA = engl. dog leukocyte antigen) identifiziert werden, welcher auf dem caninen Chromosom 12 lokalisiert ist.⁹⁷ Weiterführende Untersuchungen diesbezüglich zeigten eine hohe genetische Übereinstimmung zwischen den HLA- und den caninen DLA-Loci, so dass Aussagen über den Einfluss der Übereinstimmung im HLA-System bei der Spenderauswahl auch auf Hunde zutreffen.^{98,99} Dies bestätigte sich in Studien von Storb et al., welcher Wegbereiter für die Transplantationsforschung am Hundemodell ist. Nach myeloablativer HSZT zwischen DLA-identen Geschwistertieren konnte in 95 % der Hunde nach Transplantation ein Transplantatanwachsen erreicht werden. Seine Untersuchungen ergaben zudem ein reduziertes Anwachsen nach Transplantation eines nicht-verwandten jedoch DLA-identen Tieres. Ähnlich wie beim Menschen erzielte eine Transplantation von nicht-DLA-identen Tieren deutlich schlechtere Ergebnisse im Transplantatanwachsen.^{100,101,102,13} Die Histokompatibilität zwischen Spender und Empfänger spielt somit sowohl beim Menschen als auch beim Hund eine entscheidende Rolle im Transplantatanwachsen. Für unsere Untersuchungen wurden demnach nur Geschwistertiere ausgewählt, die innerhalb der MHC-I- sowie MHC-II-Moleküle eine 100% ige Übereinstimmung aufwiesen, um so die Wahrscheinlichkeit einer Transplantatabstoßung möglichst gering zu halten.

5.3.1. Chimärismus im Blut

In der Beurteilung des Transplantatanwachsens nach allogener Transplantation sowohl nach myeloablativem als auch nicht-myeloablativem Konditionierungsregime spielt die Analyse des hämatopoetischen Chimärismus eine entscheidende Rolle.^{103,104} Die Beobachtung der Chimärismusentwicklung erlaubt frühzeitige Aussagen über ein mögliches Transplantatversagen und ist somit auch von entscheidender therapeutischer Konsequenz. Zudem eröffnet sie die Möglichkeit, verschiedene Transplantationsregime hinsichtlich des Transplantatanwachsens miteinander zu vergleichen und somit Aussagen über dessen Effektivität zu machen. In unseren Untersuchungen nutzten wir zur Analyse des Chimärismus der peripheren Blutzellen als molekulargenetische Methode die Amplifikation von VNTR mit Hilfe der PCR. Diese erlaubt durch ihre hohe Empfindlichkeit präzise Aussagen über die Entwicklung des Chimärismus.

Nach myeloablativer allogener Stammzelltransplantation wird in der Literatur ein früher Nachweis hämatopoetischer Spenderzellen beschrieben.¹⁰⁵ In den Studien von Lapointe et al. (1996) nach myeloablativer HSZT waren bereits 24 h nach Transplantation neutrophile Granulozyten vom Spender nachweisbar, wobei der Anteil der Spendergranulozyten bis zum Tag fünf nach Transplantation bis über 90 % anstieg.¹⁰⁶ Auch die Untersuchungen von Gleissner et al. (2001) ergaben einen frühen Nachweis von Spenderzellen im Blut bereits innerhalb der ersten neun Tage nach Transplantation in allen untersuchten Patienten.¹⁰⁷ Zudem wird nach myeloablativer HSZT ein schnelles Erreichen eines vollen Spendercharakter bereits im ersten Monat nach Transplantation beschrieben.^{106,108} Auch nach nicht-myeloablativer Transplantation kommt es zu einem schnellen Anwachsen von Spenderzellen im Blut, jedoch zeigten bisherigen Studien häufiger das Auftreten eines zunächst gemischten Chimärismus und erst zu einem späteren Zeitpunkt die Ausbildung eines vollen Spendercharakters im Blut.^{109,110} Dies deckt sich mit den Ergebnissen unserer Untersuchungen, in denen in allen Tieren bereits früh (Tag +14) nach nicht-myeloablativer HSZT ein Spenderanteil sowohl in den PBMZ als auch Granulozyten detektiert werden konnte. Ein 100% iger Spendercharakter war jedoch erst an den Tagen +91 und +77 bei zwei Tieren nach Transplantation zu beobachten, so dass unsere Ergebnisse die These stützen, dass es unter der nicht-myeloablativen HSZT zu einem späteren Erreichen eines kompletten Spenderanteils verglichen mit myeloablativen Therapieregimen kommt. Die übrigen Tiere mit nachgewiesenem Langzeitchimärismus (\geq Tag +180) wiesen einen gemischten Chimärismus auf und entwickelten zu keiner Zeit einen 100% igen Spenderanteil im Blut. Diese Beobachtung eines langanhaltenden gemischten Chimärismus deckt sich mit Ergebnissen anderer Studien, in denen es ebenfalls nach nicht-myeloablativer Transplantation zu einem anhaltenden Nachweis eines Spender- und Empfängeranteils im Blut kam.¹¹¹ Zudem konnte bei bestimmten Erkrankungen wie der Thalassämie und Sichelzellanämie eine Heilung unter Ausbildung eines anhaltenden gemischten Chimärismus nach HSZT beobachtet werden.^{112,113} Obgleich das Erreichen eines 100% igen Spenderanteils im Blut in Studien an Patienten mit malignen Grunderkrankungen mit einer Senkung des Risikos für ein Rezidiv

bzw. Fortschreiten der Erkrankung assoziiert ist, ist somit auch dem gemischten Chimärismus eine klinische Relevanz hinsichtlich eines positiven klinischen Effektes bei nicht-malignen Grunderkrankungen zuzuschreiben.¹¹⁴

Auf Grund der bisherigen Literatur bestand generell die Annahme, dass es nach nicht-myeloablativer Konditionierung zu einem späteren Transplantatanwachsen kommt. In einer neueren Studie von Mickelson et al. (2011) konnte jedoch sowohl bezüglich des Zeitpunktes des Transplantatanwachsens als auch bezüglich des Erreichens eines 100% igen Spenderanteil in den T-Zellen kein signifikanter Unterschied nach myeloablativer versus nicht-myeloablative Transplantation gezeigt werden.¹¹⁵ Sicherlich spielt hierbei das gewählte Konditionierungsregime eine entscheidende Rolle, aber auch die Tatsache, dass eine Vielzahl von toxisitätsreduzierten myeloablativen Regimen fälschlicherweise oft als nicht-myeloablative bezeichnet wird. Es gibt echte nicht-myeloablative Regime sowohl mit als auch ohne vorangehende TBI. Dass diese jedoch einen entscheidenden Faktor für ein erfolgreiches Transplantatanwachsen darstellt, konnte bereits in den Studien von Storb et al. gezeigt werden. Unter einer Bestrahlungsdosis von 9,2 Gy konnte auch ohne anschließender Immunsuppression in seinen Untersuchungen in 95 % der transplantierten Tiere ein dauerhaftes Transplantatanwachsen erreicht werden, während eine Reduktion der Bestrahlungsdosis auf 4,5 Gy wiederum zu geringeren Anwachsrate führte.^{13,14} Eine Bestrahlungsdosis < 2 Gy führte schließlich zu keinem dauerhaften Anwachsen der Spenderzellen.^{111,116} Hogan et al. (2003) konnten an Hunden zeigen, dass unter einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy mit anschließender Immunsuppression mit Cyclosporin A und Sirolimus bei fünf von sechs Hunden (83 %) ein dauerhaftes Transplantatanwachsen (gemischter Chimärismus) möglich ist.¹¹⁷ In unseren Versuchen nutzten wir als Immunsuppression den mTOR-Inhibitor Everolimus an Stelle von Sirolimus bei sonst gleichem Konditionierungsregime mit einer TBI von 2 Gy sowie anschließender Gabe von CSA. Zwar konnte in allen Hunden ein frühes Transplantatanwachsen an Tag +14 nach Transplantation gezeigt werden, jedoch nur fünf von insgesamt neun Hunden bildeten einen Langzeitchimärismus (\geq Tag +180) in den Granulozyten sowie PBMZ aus. Der mediane maximale Spender-Chimärismus dieser Tiere lag bei 100 % (Spannweite: 82-100 %) in den Granulozyten sowie 81 % (Spannweite: 33-100 %) in den PBMZ. Einer der Hunde mit nachgewiesenem Langzeitchimärismus entwickelte im Verlauf (Tag +391 nach Transplantation) dennoch eine Transplantatabstoßung. Insgesamt konnte somit ein dauerhaftes Transplantatanwachsen in 44 % der Tiere erreicht werden. Unter dem Konditionierungsregime mit einer TBI von 2 Gy und anschließender Gabe von CSA sowie MMF konnte bereits in früheren Studien an Hunden in über 50 % der Tiere ein Langzeitchimärismus in den Blutzellen erreicht werden.¹¹⁶ In den Untersuchungen von Storb et al. zeigte sich unter diesem Therapieregime sogar ein dauerhaftes Transplantatanwachsen in bis zu 92 % der transplantierten Hunde.^{111,118} Insgesamt lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass im Vergleich zu anderen nicht-myeloablativen Therapieregimen geringere Anwachsrate unter Everolimus als Immunsuppression in

Kombination mit CSA post transplantationem zu verzeichnen sind. Obgleich sich Everolimus in Kombination mit CSA in bisherigen Studien nach soliden Organtransplantationen als gut geeignet in der Prävention einer Transplantatabstoßung zeigte, scheint es nach unseren Ergebnissen nicht geeignet zu sein für die generelle Anwendung nach nicht-myeloablativer Transplantation hämatopoetischer Stammzellen, da hierunter die Rate eines dauerhaften Transplantatanwachsens geringer ist.

5.3.2. Chimärismus der Langerhans-Zellen

Wie bereits zur Analyse des Chimärismus der peripheren Blutzellen nutzten wir auch in der Untersuchung des Chimärismus der LZ in der Haut als molekulargenetische Methode die Amplifikation von VNTR mit Hilfe der PCR. Bisher gibt es nur eine publizierte Studie, welche die Methode der Amplifikation von STR zur Chimärismusanalyse der LZ anwendet. Hier wird jedoch davon berichtet, dass zu einem frühen Zeitpunkt nach Transplantation (Tag +18) durch die in diesem Zeitraum noch limitierten LZ-Zahlen keine Chimärismusanalysen möglich waren.⁸¹ In unseren Untersuchungen zeigte sich die Methodik der Amplifikation von VNTR mittels PCR zur Chimärismusanalyse selbst bei geringen Zellzahlen, die sich aus der limitierten Größe der zumutbaren Hautbiopsien ergibt, als sehr gut geeignet. Lediglich bei einer Probe (Hund 7) konnte auf Grund einer zu geringen DNA-Menge keine Auswertung des Chimärismus erfolgen, wobei die zuvor isolierten LZ-Zahlen aus dem Hautbiopsat mit $3,8 \times 10^4$ Zellen/101 mm² weit über der von uns ermittelten geringsten Zellzahl von $0,3 \times 10^4$ Zellen/101 mm² zweier anderer Proben lag. Da trotz dieser geringen Zellzahl von $0,3 \times 10^4$ Zellen/101 mm² bei beiden Proben eine Chimärismusanalyse komplikationslos möglich war, gehen wir davon aus, dass die Ursache der zu geringen DNA-Menge bei Hund sieben durch einen Zellverlust in der weiteren Aufbereitung der LZ (LZ-DNA-Replikation sowie Aufbereitung in Vorbereitung auf die kapillarelektrophoretische Messung) zu suchen ist.

Bisherige Studien konnten nach myeloablativer allogener Stammzelltransplantation einen schnellen Wechsel der LZ vom Empfänger- zum Spendertyp nachweisen. So zeigte sich in den Untersuchungen von Auffermann-Gretzinger et al. (2006) bereits bis Tag +56 (Untersuchungszeitraum Tag +18-56) ein überwiegender Spenderanteil von 87 % in den LZ nach myeloablativer Transplantation.⁸¹ In unseren Untersuchungen erfolgte die erste Chimärismusanalyse der LZ an Tag +28 nach nicht-myeloablativer Transplantation, wobei keines der Tiere zu diesem Zeitpunkt Spender-LZ in der Haut aufwies. Auch an Tag +56 waren die LZ noch überwiegend vom Empfängertyp. Erstmalig an Tag +105 nach Transplantation war lediglich bei einem Tier (Hund 4) mit 89 % der überwiegende Anteil der LZ vom

Spendertyp. Diese Ergebnisse zeigen, dass es nach nicht-myeloablativer Transplantation verglichen mit ursprünglichen myeloablativen Therapieansätzen zu einem verzögerten Wechsel der LZ vom Empfänger- zum Spendertyp kommt. Unsere Ergebnisse decken sich diesbezüglich mit den Untersuchungen von Collin et al. (2006). Auch hier zeigten sich an Tag +40 nach nicht-myeloablativer Transplantation überwiegend Empfänger-LZ mit einem medianen Spenderanteil von 36,5 %, während Patienten nach myeloablativer Transplantation am selben Tag bereits überwiegend Spender-LZ (Median 97 %) aufwiesen.⁷⁵ Ursächlich für diese verzögerte Chimärismusedwicklung in den LZ nach nicht-myeloablativer Transplantation ist am ehesten das längere Überleben der Empfänger-LZ in der Haut auf Grund der geringeren therapiebezogenen Toxizität und somit auch das Vorhandensein eines geringeren Angebots an „freien LZ-Plätzen“, welche als Triggermechanismus für die Einwanderung von Spender-LZ in die Haut dienen.

In unserer Versuchsreihe zeigte ein Hund bezüglich seines LZ-Chimärismus eine Abweichung im Vergleich zu den anderen Tieren. Bei diesem Tier konnte bereits an Tag +105 nach Transplantation mit 89 % ein hoher Anteil von LZ vom Spender nachgewiesen werden. Dieser Hund entwickelte ab Tag +96 als einziges Tier in unserer Versuchsreihe eine akute GvHD mit Haarausfall, Exanthemen sowie gastrointestinalen Beschwerden wie Erbrechen und Diarrhoe. Auch in den Blutzellen zeigte sich ab Tag +77 dauerhaft ein 100% iger Spenderchimärismus. Diese Beobachtung deckt sich mit den Beobachtungen bisheriger Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass es unter der Ausbildung einer GvHD zu einem schnellen Wechsel des Chimärismus vom Empfänger- zum Spender sowohl in den peripheren Blutzellen als auch in den dermalen LZ kommt.^{66,75,119} In der Literatur wird zudem unter einer akuten Haut-GvHD ein Absinken der LZ-Zahl beschrieben.^{75,82,84,85} Dies konnten wir in unseren Untersuchungen nicht beobachten. Ursächlich kann hier die angewandte Methode der Zellisolierung sein, da unter der von uns genutzten Methodik mehrfache Waschvorgänge nötig sind, welche anfällig für Zellverluste sind. Zwar konnten wir bezogen auf die medianen LZ-Zahlen verglichen zu anderen Studien ähnliche LZ-Zahlen/mm² erzielen (siehe 5.1.), die Beurteilung der Zellzahlentwicklung bei einem einzelnen Tier kann aus dem oben genannten Grund bei der von uns genutzten Methodik jedoch deutlichen Schwankungen unterliegen. Studien, die einen Unterschied in der Zellzahl der LZ unter einer akuten GvHD aufzeigen konnten, nutzten meist die Methode der Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Diese Methode ist mit einem geringeren Risiko an Zellverlusten verbunden, da sie die LZ durch eine an den CD-1a-Antikörper gekoppelte fluoreszierende Substanz unter dem Fluoreszenz-Mikroskop direkt in der Epidermis sichtbar macht. Schließlich gibt es jedoch eine Studie von Auffermann-Gretzinger et. al (2006), die ebenfalls keinen signifikanten Unterschied bezüglich der LZ-Zell-Zahl mit und ohne GvHD aufzeigen konnte.⁸¹ Auch hier wurden die LZ aus der Haut zuvor isoliert, so dass auch hier die Gefahr von Zellverlusten unter der Aufarbeitung durch Waschvorgänge größer ist. Letztlich sind keine generellen Aussagen durch unsere Untersuchungen bezüglich der Zell-Zahl unter einer akuten GvHD

möglich, da es sich um lediglich ein Tier handelte, welches eine GvHD ausbildete. Geht man jedoch davon aus, dass die akute GvHD zu einem Abfall der LZ-Zahl führt, kann dies ursächlich für den schnellen Anstieg des Spenderchimärismus der LZ in dem von der akuten GvHD betroffenen Tier in unseren Untersuchungen sein. Merad et al. (2002) beschäftigten sich mit der Suche nach Mechanismen, welche zur Rekrutierung von LZ aus dem zirkulierenden Blut in die Haut führen. Es zeigte sich, dass neben proinflammatorischen Zytokinen auch freie Plätze in der Haut die Rekrutierung beeinflussen.⁶⁵ Dies wäre eine Erklärung für den schnellen Wechsel des Chimärismus der LZ zum Spender hin. Durch die Verringerung der LZ-Zahl unter einer akuten GvHD entsteht eine „Lücke“ in der Haut, die schließlich durch zirkulierende LZ vom Spender, welche aus dem transplantierten Knochenmark stammen, gefüllt wird.

Interessant war im Weiteren die Entwicklung des LZ-Chimärismus verglichen mit dem Chimärismus der peripheren Blutzellen. Während sich bereits an Tag +14 bei allen Tieren sowohl in den Granulozyten als auch in den PBMZ Spenderzellen nachweisen ließen, zeigte sich die Chimärismusentwicklung der LZ vom Empfänger zum Spender im Vergleich zu den peripheren Blutzellen signifikant verzögert. Insgesamt konnten wir in unseren Untersuchungen drei verschiedene Entwicklungsverläufe des Chimärismus abhängig von den peripheren Blutzellen beobachten. 1) Kam es in den Blutzellen zu einer frühen Transplantatabstoßung bis Tag +105, konnten zu keiner Zeit LZ vom Spender in der Haut nachgewiesen werden. 2) Tiere bei denen ein dauerhaftes Transplantatanwachsen in den peripheren Blutzellen beobachtet werden konnte, wiesen zeitlich verzögert auch einen stetigen Anstieg des Spenderanteils der LZ auf. 3) Kam es nach frühem Transplantatanwachsen schließlich doch zu einer Transplantatabstoßung in der späten Post-Transplantationsphase nach Tag +105 bzw. zeigte sich ab diesem Zeitpunkt ein stetiger Abfall des Spenderanteils in den Blutzellen als Hinweis auf eine mögliche anstehende Transplantatabstoßung, konnte dennoch in den LZ ein fortwährender Anstieg des Spenderanteils nachgewiesen werden. Diesen Anstieg der Spender-LZ in der Haut trotz stetiger Abnahme des Spenderanteils in den peripheren Blutzellen konnten wir bei zwei Tieren nachweisen (Hund 6, 7). Eine ähnliche Beobachtung konnte auch in den Untersuchungen von Collin et al. gemacht werden, wobei in der Publikation lediglich davon berichtet wird, dass nach später Transplantatabstoßung im Blut (an Tag +60-100 nach HSZT) nicht der gleiche Verlauf in den LZ gesehen wurde. Genauere Angaben über den Chimärismus der LZ im Verlauf (insbesondere über einen eventuellen weiteren Anstieg des LZ-Spenderanteils) werden nicht gemacht, jedoch wird bereits auch hier ein vom Blut unabhängiger Mechanismus der weiteren Entwicklung des Chimärismus diskutiert.⁷⁵ Man weiß heute, dass LZ aus dem Knochenmark in die Epidermis eingewanderte dendritische Zellen sind. Jedoch wurde bereits 1987 vermutet, dass sie auch in der Lage sind, lokal in der Haut zu proliferieren. Diese Vermutung entstammt Studien an Mäusen, die nach einer myeloablativen Bestrahlungsdosis noch 18 Monate danach LZ vom Empfänger zeigten, obwohl die dendritischen Zellen

aller anderen Organe bereits den Haplotypen des Spenders trugen.⁶⁴ Merad et. al (2002) konnten schließlich später die Möglichkeit der lokalen Proliferation der LZ in der Haut beweisen, in dem sie in Mitose befindliche LZ in humanen Hauttransplantaten auf Mäusen nachweisen konnten.⁶⁵ Diese Möglichkeit der lokalen Proliferation ist die wahrscheinlichste Ursache des in unseren Untersuchungen beobachteten Anstiegs der Spender-LZ in der Haut trotz Transplantatabstoßung im Blut. Voraussetzung ist jedoch, dass bereits vor der Abstoßung LZ vom Spender in die Haut eingewandert sind. Dies erklärt auch, warum es nach früher Transplantatabstoßung (bis Tag +105) zu keinem ansteigenden LZ-Spenderchimärismus kam, da zu diesem Zeitpunkt noch alle LZ vom Empfänger waren.

Bezüglich des zu den Blutzellen zeitlich verzögerten Wechsels der LZ vom Empfänger zum Spender stimmen unsere Daten mit denen der Studie von Collin et al überein. Auch hier konnte ein im Vergleich zum Chimärismus im Blut verspätetes Anwachsen der Spender-LZ gezeigt werden. So konnten wir bereits am Tag +14 nach HSZT bei allen Tieren in den peripheren Blutzellen einen medianen Spenderanteil von 34 % in den Granulozyten sowie 16 % in den PBMZ nachweisen, während keines der Tiere auch bis Tag +28 nach HSZT einen Spenderanteil in den LZ zeigte. In unseren Untersuchungen sahen wir zu keinem Zeitpunkt (auch nach Tag +400 nach HSZT) einen 100% igen Spenderanteil in den LZ, obgleich einzelne Tiere einen kompletten Spenderanteil in den Blutzellen zeigten. Diesbezüglich unterscheiden sich unsere Ergebnisse von denen früherer Studien. So konnten Collin et al. bei Nachweis eines 100% igen Spenderanteils im Blut ein Jahr nach Transplantation diesen auch regelmäßig in den LZ nachweisen. Ursächlich hierfür ist am ehesten das von uns genutzte Therapieregime der RIC, welches bereits unter Punkt 4.3.1. als weniger geeignet für ein dauerhaftes Transplantatanwachsen beschrieben wurde.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass es nach nicht-myeloablativem Therapieregime zu einem längeren Persistieren von Empfänger-LZ in der Haut kommt. Frühere Studien konnten bereits darauf hinweisen, dass das Verbleiben von Empfänger-LZ ursächlich für das Auftreten einer akuten Haut-GvHD ist.^{68,74} Darauf aufbauend erklärt sich durch unsere Beobachtung, dass auch noch nach über einem Jahr Empfänger-LZ in der Haut nachweisbar sind, weshalb nach nicht-myeloablativer Transplantation, entgegen der früheren Einteilung, auch noch nach Tag +100 das Auftreten einer akuten GvHD beobachtet werden kann.

6. Zusammenfassung

In den letzten Jahren konzentrierte sich die Forschung in der hämatopoetischen Stammzelltransplantation zunehmend auf Transplantationsregime mit reduzierter Konditionierung, da diese verglichen zu myeloablativen Therapieansätzen durch ihre geringere Toxizität zu einer Reduktion der therapiebezogenen Mortalität führen und dennoch einen kurativen Therapieansatz darstellen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte das Transplantatanwachsen an insgesamt neun Hunden nach nicht-myeloablativer Knochenmarktransplantation mit einer initialen TBI von 2 Gy und einer anschließenden Immunsuppression bestehend aus Cyclosporin A und Everolimus. Es konnte gezeigt werden, dass unter diesem Konditionierungsregime in allen Tieren ein frühes Transplantatanwachsen im Blut möglich war.

Detailliert wurde die Entwicklung des Chimärismus nach nicht-myeloablativer HSZT in den Langerhans-Zellen der Haut untersucht. Hierfür wurde zunächst eine Methodik zur Isolierung caniner LZ aus der Haut etabliert, welche sich durch anschließende Messungen der erhaltenen Zellzahlen, der Reinheit der LZ sowie durch elektronenmikroskopische Darstellungen mit Nachweis von Birbeck-Granula als sehr gut geeignet erwies. Auch die anschließende Analyse des Chimärismus mit der Amplifikation von VNTR mit Hilfe der PCR konnte erstmalig erfolgreich an caninen LZ durchgeführt werden. Die Chimärismusanalyse der LZ nach HSZT mit reduzierter Konditionierung ergab, dass es nach nicht-myeloablativer Transplantation zu einem verzögerten Auftreten von Spender-Langerhans-Zellen in der Haut kommt. Im Unterschied zu myeloablativen Therapieregimen sind LZ des Empfängers auch noch nach über einem Jahr in der Haut nachweisbar. Da unter anderem verbleibende LZ des Empfängers für das Auftreten einer akuten GvHD verantwortlich sind, kann nach nicht-myeloablativer Transplantation durch diese lange Persistenz der Empfänger-LZ in der Haut die akute GvHD entgegen der alten Definition auch noch weit nach Tag 100 auftreten.

Ferner konnte ein Unterschied im LZ-Chimärismus verglichen mit dem Chimärismus in den peripheren Blutzellen beobachtet werden. So zeigte sich die Chimärismusentwicklung vom Empfänger zum Spender in den LZ verglichen zu den peripheren Blutzellen signifikant verzögert. Zudem kam es bei keinem der Tiere in dem untersuchten Zeitraum zu einem 100% igen Spenderanteil in den LZ, auch wenn dieser im peripheren Blut nachzuweisen war. Dennoch konnten Zusammenhänge zwischen dem Blut- und LZ-Chimärismus aufgezeigt werden. So entwickelten langzeitchimäre Tiere einen fortwährend steigenden Spenderanteil in den LZ. Kam es zu einer frühen Transplantatabstoßung, konnte sich zu keiner Zeit ein Spenderanteil in den LZ entwickeln. Hatte sich jedoch einmal ein Spenderanteil in den LZ ausgebildet, so stieg dieser im Verlauf fortwährend an, auch wenn es im Blut

später zu einer Transplantatabstoßung bzw. zu einem erneuten Abfall des Spenderanteils kam. Dies zeigt, dass sich LZ durch lokale Proliferation in der Haut weiter unabhängig vom Knochenmark vermehren können.

Da die Haut das am häufigsten betroffene Organ bei der akuten GvHD ist, ist es wichtig in der Zukunft geeignete therapeutische Strategien zu entwickeln, um der Ausbildung einer akuten Haut-GvHD vorzubeugen. Die Ergebnisse in dieser Arbeit über die Entwicklung und Kinetik des Spenderchimärismus in den LZ liefern hierfür wichtige Grundlagen und stellen somit für die Klinik wichtige Angriffspunkte in der Therapie zur Vermeidung des Auftretens der akuten GVHD der Haut dar.

7. Literaturverzeichnis

1. Thomas ED., Lochte HL, Cannon JH, et al. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J. Clin. Invest.* 38, 1709–1716 (1959).
2. Blaise D, Kuentz M, Fortanier C, et al. Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: a report from the Société Française de Greffe de Moelle. *J. Clin. Oncol.* 18, 537–546 (2000).
3. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N. Engl. J. Med.* 344, 175–181 (2001).
4. Schmitz N, Beksac M, Hasenclever D, et al. Transplantation of mobilized peripheral blood cells to HLA-identical siblings with standard-risk leukemia. *Blood* 100, 761–767 (2002).
5. Schrezenmeier H., Beelen D. W. (2008)
Jahresbericht (2007), öffentlicher Teil. Deutsches Register für Stammzelltransplantationen (DRST).
[Online im Internet:] URL: <http://www.drst.de/download/jb2007.pdf> [Stand: 22.07.2013, 20:12]
6. Passweg JR, Baldomero H, Gratwohl A, et al. The EBMT activity survey: 1990-2010. *Bone Marrow Transplant.* 47, 906-923 (2012).
7. Goldberg JD, Chou JF, Horwitz S, et al. Long-term survival in patients with peripheral T-cell non-Hodgkin lymphomas after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Leuk. Lymphoma* 53, 1124–1129 (2012).
8. Kim JW, Kim BS, Bang SM, et al. Allogeneic stem cell transplantation in patients with non-Hodgkin lymphoma who experienced relapse or progression after autologous stem cell transplantation. *Ann. Hematol.* 90, 1409–1418 (2011).
9. Ottinger HD, Müller C, Riebschläger S, et al. (2005).
Dritter Deutscher Konsensus zur immungenetischen Spenderauswahl für die allogene Stammzelltransplantation.
[Online im Internet:] URL: http://www.immungenetik.de/data/Konsensus_Version_AugustFinal_2005.pdf [Stand: 20.07.2013, 19:35]
10. Bethge WA, Faul C, Bornhäuser M, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: an update. *Blood Cells Mol. Dis.* 40, 13–19 (2008).
11. Beelen D. W., Mytilineos J. (2012)
Jahresbericht (2011). Deutsches Register für Stammzelltransplantationen (DRST).
[Online im Internet:] URL: <http://www.drst.de/download/jb2011.pdf> [Stand: 20.07.2013, 16:30]

12. Hertenstein B & Ganser A. Knochenmarktransplantation. *Internist* 45, 1261–1267 (2004).
13. Storb R, Raff RF, Appelbaum FR, et al. What radiation dose for DLA-identical canine marrow grafts? *Blood* 72, 1300–1304 (1988).
14. Storb R, Raff RF, Appelbaum FR, et al. DLA-identical bone marrow grafts after low-dose total body irradiation: the effect of canine recombinant hematopoietic growth factors. *Blood* 84, 3558–3566 (1994).
15. Hegenbart U, Niederwieser D, Sandmaier BM, et al. Treatment for acute myelogenous leukemia by low-dose, total-body, irradiation-based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *J. Clin. Oncol.* 24, 444–453 (2006).
16. Khouri IF, Saliba RM, Giralt SA, et al. Nonablative allogeneic hematopoietic transplantation as adoptive immunotherapy for indolent lymphoma: low incidence of toxicity, acute graft-versus-host disease, and treatment-related mortality. *Blood* 98, 3595–3599 (2001).
17. Giralt S, Thall PF, Khouri I, et al. Melphalan and purine analog-containing preparative regimens: reduced-intensity conditioning for patients with hematologic malignancies undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Blood* 97, 631–637 (2001).
18. Champlin R, Khouri I, Anderlini P, et al. Nonmyeloablative preparative regimens for allogeneic hematopoietic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 27 Suppl 2, S13–22 (2001).
19. De Lima M, Anagnostopoulos A, Munsell M, et al. Nonablative versus reduced-intensity conditioning regimens in the treatment of acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: dose is relevant for long-term disease control after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 104, 865–872 (2004).
20. Slavin S. Reduced-intensity conditioning or nonmyeloablative stem cell transplantation: introduction, rationale, and historic background. *Semin. Oncol.* 31, 1–3 (2004).
21. Niederwieser D, Maris M, Shizuru JA, et al. Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated donors and postgrafting immunosuppression with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases. *Blood* 101, 1620–1629 (2003).
22. Massenkeil G, Nagy M, Lawang M, et al. Reduced intensity conditioning and prophylactic DLI can cure patients with high-risk acute leukaemias if complete donor chimerism can be achieved. *Bone Marrow Transplant.* 31, 339–345 (2003).
23. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 97, 3390–3400 (2001).
24. Sandmaier BM, Mackinnon S & Childs RW. Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic cell transplantation: current perspectives. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13, 87–97 (2007).

25. Storb R, Doney KC, Thomas ED, et al. Marrow transplantation with or without donor buffy coat cells for 65 transfused aplastic anemia patients. *Blood* 59, 236–246 (1982).
26. Sorror ML, Maris MB, Storer B, et al. Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influence of pretransplantation comorbidities. *Blood* 104, 961–968 (2004).
27. Escalón MP, Champlin RE, Saliba RM, et al. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic transplantation: a promising salvage therapy for patients with non-Hodgkin's lymphoma whose disease has failed a prior autologous transplantation. *J. Clin. Oncol.* 22, 2419–2423 (2004).
28. Morris E, Thomson K, Craddock C, et al. Outcomes after alemtuzumab-containing reduced-intensity allogeneic transplantation regimen for relapsed and refractory non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 104, 3865–3871 (2004).
29. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, et al. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 102, 756–762 (2003).
30. Aoudjhane M, Labopin M, Gorin NC, et al. Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukaemia: a retrospective survey from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia* 19, 2304–2312 (2005).
31. Valks R, Fernández-Herrera J, Bartolomé B, et al. Late appearance of acute graft-vs-host disease after suspending or tapering immunosuppressive drugs. *Arch Dermatol* 137, 61–65 (2001).
32. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 11, 945–956 (2005).
33. Ho VT & Soiffer RJ. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 98, 3192–3204 (2001).
34. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* 369, 1947–1954 (2007).
35. Eapen M, Horowitz MM, Klein JP, et al. Higher mortality after allogeneic peripheral-blood transplantation compared with bone marrow in children and adolescents: the Histocompatibility and Alternate Stem Cell Source Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *J. Clin. Oncol.* 22, 4872–4880 (2004).

36. Klingebiel T & Schlegel PG. GVHD: overview on pathophysiology, incidence, clinical and biological features. *Bone Marrow Transplant.* 21 Suppl 2, S45–49 (1998).
37. Jacobsohn DA & Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis*, 2:35 (2007) (doi:10.1186/1750-1172-2-35).
38. Vogelsang GB. How I treat chronic graft-versus-host disease. *Blood* 97, 1196–1201 (2001).
39. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 18, 295–304 (1974).
40. Aractingi S & Chosidow O. Cutaneous graft-versus-host disease. *Arch Dermatol* 134, 602–612 (1998).
41. Volc-Platzter B. Graft versus host disease. *Hautarzt* 43, 669–677 (1992).
42. Tampi R, Barr AL & Zilko PJ. Case report. Successful treatment of chronic cutaneous graft-versus-host-disease (GVHD) with penicillamine. *Clin Lab Haematol* 6, 393–394 (1984).
43. Vogelsang GB & Arai S. Mycophenolate mofetil for the prevention and treatment of graft-versus-host disease following stem cell transplantation: preliminary findings. *Bone Marrow Transplant.* 27, 1255–1262 (2001).
44. Bisaccia E, Palangio M, Gonzalez J, et al. Treating refractory chronic graft-versus-host disease with extracorporeal photochemotherapy. *Bone Marrow Transplant.* 31, 291–294 (2003).
45. Bisaccia E, Palangio M, Gonzalez J, et al. Treatment of extensive chronic graft-versus-host disease with extracorporeal photochemotherapy. *J Clin Apher* 21, 181–187 (2006).
46. Wolff D, Gerbitz A, Ayuk F, et al. Consensus conference on clinical practice in chronic graft-versus-host disease (GVHD): first-line and topical treatment of chronic GVHD. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 16, 1611–1628 (2010).
47. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 271–296 (1991).
48. Schmitt DA, Bieber T, Cazenave JP, et al. Fc receptors of human Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 94, 15S–21S (1990).
49. Bieber T, Rieger A, Neuchrist C, et al. Induction of Fc epsilon R2/CD23 on human epidermal Langerhans cells by human recombinant interleukin 4 and gamma interferon. *J. Exp. Med.* 170, 309–314 (1989).
50. Bieber T. IgE receptors in Langerhans cells. A link between the environment and the immune system? *Hautarzt* 43, 753–762 (1992).
51. Haas N, Hamann K, Grabbe J, et al. Demonstration of the high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on Langerhans cells of oral mucosa. *Exp. Dermatol.* 2, 157–160 (1993).
52. Harms D & Müller KM. Histopathological aspects of Langerhans cell histiocytosis. With emphasis on the pulmonary form. *Pathologe* 22, 175–183 (2001).

53. Berger CL, Chu A, Fithian E, et al. The diagnostic use of monoclonal antibodies in a variety of dermatologic conditions. *Am J Dermatopathol* 5, 85–94 (1983).
54. Birbeck MS, Breathnach AS & Overall JD. An Electron Microscope Study of Basal Melanocytes and High-Level Clear Cells (Langerhans Cells) in Vitiligo. *The Journal of Investigative Dermatology* 37, 51–64 (1961).
55. Valladeau J, Dezutter-Dambuyant C & Saeland S. Langerin/CD207 sheds light on formation of birbeck granules and their possible function in Langerhans cells. *Immunol. Res.* 28, 93–107 (2003).
56. Romani N, Holzmann S, Tripp CH, et al. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS* 111, 725–740 (2003).
57. Pavelka M & Roth J. Funktionelle Ultrastruktur: Atlas Der Biologie und Pathologie Von Geweben. (Springer DE, 2005).
58. Jaitley S & Saraswathi T. Pathophysiology of Langerhans cells. *J Oral Maxillofac Pathol* 16, 239–244 (2012).
59. Schwarzenberger K & Udey MC. Contact allergens and epidermal proinflammatory cytokines modulate Langerhans cell E-cadherin expression in situ. *J. Invest. Dermatol.* 106, 553–558 (1996).
60. Tang A, Amagai M, Granger LG, et al. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361, 82–85 (1993).
61. Kraal G, van Wilsem E & Brevé J. The phenotype of murine Langerhans cells from skin to lymph node. *In Vivo* 7, 203–206 (1993).
62. Schuler G & Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* 161, 526–546 (1985).
63. Emile JF, Fraitag S, Leborgne M, et al. Langerhans' cell histiocytosis cells are activated Langerhans' cells. *J. Pathol.* 174, 71–76 (1994).
64. Czernielewski JM & Demarchez M. Further evidence for the self-reproducing capacity of Langerhans cells in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 88, 17–20 (1987).
65. Merad M, Manz MG, Karsunky H, et al. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat. Immunol.* 3, 1135–1141 (2002).
66. Bogunovic M, Ginhoux F, Wagers A, et al. Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men. *J. Exp. Med.* 203, 2627–2638 (2006).
67. Volc-Platzer B, Stingl G, Wolff K, et al. Cytogenetic identification of allogeneic epidermal Langerhans cells in a bone-marrow-graft recipient. *N. Engl. J. Med.* 310, 1123–1124 (1984).
68. Perreault C, Pelletier M, Belanger R, et al. Persistence of host Langerhans cells following allogeneic bone marrow transplantation: possible relationship with acute graft-versus-host disease. *Br. J. Haematol.* 60, 253–260 (1985).

69. Suitters AJ & Lampert IA. The loss of Ia+ Langerhans' cells during graft-versus-host disease in rats. *Transplantation* 36, 540–546 (1983).
70. Kaye VN, Neumann PM, Kersey J, et al. Identity of immune cells in graft-versus-host disease of the skin. Analysis using monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am. J. Pathol.* 116, 436–440 (1984).
71. Dreno B, Milpied N, Harousseau JL, et al. Cutaneous immunological studies in diagnosis of acute graft-versus-host disease. *Br. J. Dermatol.* 114, 7–15 (1986).
72. Breathnach SM, Shimada S, Kovac Z, et al. Immunologic aspects of acute cutaneous graft-versus-host disease: decreased density and antigen-presenting function of Ia+ Langerhans cells and absent antigen-presenting capacity of Ia+ keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 86, 226–234 (1986).
73. Sviland L, Pearson AD, Green MA, et al. Immunopathology of early graft-versus-host disease--a prospective study of skin, rectum, and peripheral blood in allogeneic and autologous bone marrow transplant recipients. *Transplantation* 52, 1029–1036 (1991).
74. Merad M, Hoffmann P, Ranheim E, et al. Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat. Med.* 10, 510–517 (2004).
75. Collin MP, Hart DN, Jackson GH, et al. The fate of human Langerhans cells in hematopoietic stem cell transplantation. *J. Exp. Med.* 203, 27–33 (2006).
76. Bortz J & Lienert GA. *Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung*. 2. Auflage Heidelberg: Springer-Verlag, 2002: 134-142.
77. Goker H, Haznedaroglu IC & Chao NJ. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp. Hematol.* 29, 259–277 (2001).
78. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285, 412–415 (1999).
79. Zhang Y, Louboutin JP, Zhu J, et al. Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T cell-mediated acute graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* 109, 1335–1344 (2002).
80. Li H, Kaplan DH, Matte-Martone C, et al. Langerhans cells are not required for graft-versus-host disease. *Blood* 117, 697–707 (2011).
81. Auffermann-Gretzinger S, Eger L, Bornhäuser M, et al. Fast appearance of donor dendritic cells in human skin: dynamics of skin and blood dendritic cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation* 81, 866–873 (2006).
82. Perreault C, Pelletier M, Landry D, et al. Study of Langerhans cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 63, 807–811 (1984).
83. Volc-Platzer B, Rappersberger K, Mosberger I, et al. Sequential immunohistologic analysis of the skin following allogeneic bone marrow transplantation. *J. Invest. Dermatol.* 91, 162–168 (1988).

84. Sloane JP, Thomas JA, Imrie SF, et al. Morphological and immunohistological changes in the skin in allogeneic bone marrow recipients. *J. Clin. Pathol.* 37, 919–930 (1984).
85. Murphy GF, Merot Y, Tong AK, et al. Depletion and repopulation of epidermal dendritic cells after allogeneic bone marrow transplantation in humans. *J. Invest. Dermatol.* 84, 210–214 (1985).
86. Gil L, Styczynski J & Komarnicki M. Infectious complication in 314 patients after high-dose therapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation: risk factors analysis and outcome. *Infection* 35, 421–427 (2007).
87. Gahrton G, Iacobelli S, Bandini G, et al. Peripheral blood or bone marrow cells in reduced-intensity or myeloablative conditioning allogeneic HLA identical sibling donor transplantation for multiple myeloma. *Haematologica* 92, 1513–1518 (2007).
88. Martino R, Iacobelli S, Brand R, et al. Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. *Blood* 108, 836–846 (2006).
89. Vítko S, Margreiter R, Weimar W, et al. Three-year efficacy and safety results from a study of everolimus versus mycophenolate mofetil in de novo renal transplant patients. *Am. J. Transplant.* 5, 2521–2530 (2005).
90. Shiah HS, Chen CY, Dai CY, et al. Randomised clinical trial: comparison of two everolimus dosing schedules in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 37, 62–73 (2013).
91. Junghanss C, Rathsack S, Wacke R, et al. Everolimus in combination with cyclosporin a as pre- and posttransplantation immunosuppressive therapy in nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 18, 1061–1068 (2012).
92. Ramírez P, Brunstein CG, Miller B, et al. Delayed platelet recovery after allogeneic transplantation: a predictor of increased treatment-related mortality and poorer survival. *Bone Marrow Transplant.* 46, 981–986 (2011).
93. Tomblyn MB, Arora M, Baker KS, et al. Myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia: analysis of graft sources and long-term outcome. *J. Clin. Oncol.* 27, 3634–3641 (2009).
94. Liu Q, Xu X, Chen YK, et al. Long-term outcomes of HLA-matched sibling compared with mismatched related and unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation for chronic phase chronic myelogenous leukemia: a single institution experience in China. *Ann. Hematol.* 90, 331–341 (2011).
95. Zhang Y, Chen YK, Fan ZP, et al. [Impact of HLA compatibility on the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 31, 438–442 (2011).

96. Kumar P, Defor TE, Brunstein C, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult acute lymphocytic leukemia: impact of donor source on survival. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14, 1394–1400 (2008).
97. Templeton JW & Thomas ED. Evidence for a major histocompatibility locus in the dog. *Transplantation* 11, 429–431 (1971).
98. Sarmiento UM & Storb RF. Characterization of class II alpha genes and DLA-D region allelic associations in the dog. *Tissue Antigens* 32, 224–234 (1988).
99. Sarmiento UM & Storb RF. Restriction fragment length polymorphism of the major histocompatibility complex of the dog. *Immunogenetics* 28, 117–124 (1988).
100. Deeg HJ, Storb R, Raff RF, et al. Marrow grafts between phenotypically DLA-identical and haploidentical unrelated dogs: additional antigens controlling engraftment are not detected by cell-mediated lympholysis. *Transplantation* 33, 17–21 (1982).
101. Deeg HJ, Storb R & Thomas ED. Marrow graft studies in dogs: factors influencing resistance to engraftment and graft-versus-host disease. *Surv Immunol Res* 1, 148–154 (1982).
102. Storb R, Weiden PL, Graham TC, et al. Failure of engraftment and graft-versus-host disease after canine marrow transplantation. Two phenomena linked to but not exclusively determined by known antigens of the major histocompatibility complex. *Transplant. Proc.* 10, 113–118 (1978).
103. Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, et al. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* 15, 293–302 (2001).
104. Suttorp M, Schmitz N, Dreger P, et al. Monitoring of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation with unmanipulated marrow by use of DNA polymorphisms. *Leukemia* 7, 679–687 (1993).
105. Socie G, Lawler M, Gluckman E, et al. Studies on hemopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation in the molecular biology era. *Leuk. Res.* 19, 497–504 (1995).
106. Lapointe C, Forest L, Lussier P, et al. Sequential analysis of early hematopoietic reconstitution following allogeneic bone marrow transplantation with fluorescence in situ hybridization (FISH). *Bone Marrow Transplant.* 17, 1143–1148 (1996).
107. Gleissner B, Blau IW, Sindram A, et al. Analysis of chimerism during the early period after allogeneic peripheral stem cell transplantation. *Clin Lab Haematol* 23, 401–406 (2001).
108. Liu H, Zhai X, Song Z, et al. Busulfan plus fludarabine as a myeloablative conditioning regimen compared with busulfan plus cyclophosphamide for acute myeloid leukemia in first complete remission undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective and multicenter study. *J Hematol Oncol* 6, 15 (2013).

109. Childs R, Clave E, Contentin N, et al. Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 94, 3234–3241 (1999).
110. Baron F, Baker JE, Storb R, et al. Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood* 104, 2254–2262 (2004).
111. Storb R, Yu C, Wagner JL, et al. Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. *Blood* 89, 3048–3054 (1997).
112. Matthes-Martin S, Lawitschka A, Fritsch G, et al. Stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning for sickle cell disease. *Eur. J. Haematol.* 90, 308–312 (2013).
113. Andreani M, Manna M, Lucarelli G, et al. Persistence of mixed chimerism in patients transplanted for the treatment of thalassemia. *Blood* 87, 3494–3499 (1996).
114. Baron F, Maris MB, Sandmaier BM, et al. Graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *J. Clin. Oncol.* 23, 1993–2003 (2005).
115. Mickelson DM, Sproat L, Dean R, et al. Comparison of donor chimerism following myeloablative and nonmyeloablative allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 46, 84–89 (2011).
116. Lange S, Altmann S, Brandt B, et al. Investigation of immunological approaches to enhance engraftment in a 1 Gy TBI canine hematopoietic stem cell transplantation model. *Exp. Hematol.* 37, 143–150 (2009).
117. Hogan WJ, Little MT, Zellmer E, et al. Postgrafting immunosuppression with sirolimus and cyclosporine facilitates stable mixed hematopoietic chimerism in dogs given sublethal total body irradiation before marrow transplantation from DLA-identical littermates. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 9, 489–495 (2003).
118. Jochum C, Beste M, Zellmer E, et al. CD154 blockade and donor-specific transfusions in DLA-identical marrow transplantation in dogs conditioned with 1-Gy total body irradiation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13, 164–171 (2007).
119. El-Cheikh J, Vazquez A, Crocchiolo R, et al. Acute GVHD is a strong predictor of full donor CD3+ T cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Am. J. Hematol.* 87, 1074–1078 (2012).

8. Thesen

1. Nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation kommt es im Empfängerorganismus zu einem Wechsel von Zellen des Empfängers hin zu Zellen des Spenders.
2. Dieser Wechsel kann auch inkomplett sein und führt so zu einem gemischten Chimärismus, welcher in den verschiedenen Kompartimenten unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann.
3. Für myeloablative als auch nicht-myeloablative Konditionierungsregime ist die Entwicklung und Kinetik des Chimärismus im Kompartiment Blut bereits gut erforscht.
4. Im Falle der LZ der Haut existieren einige wenige Studien zur Chimärismusentwicklung nach myeloablativer Transplantation. Nach nicht-myeloablativer Konditionierung ist die Entwicklung des Chimärismus in LZ weitestgehend unklar.
5. LZ sind aus dem Knochenmark in die Haut eingewanderte dendritische Zellen. Sie gehören mit zu den potentesten Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems.
6. Die bisher publizierten Daten weisen darauf hin, dass persistierende LZ des Empfängers nach allogener HSZT eine zentrale Rolle in der Ausbildung einer akuten GvHD der Haut spielen.
7. Basierend auf der Beobachtung, dass die akute GvHD der Haut nach nicht-myeloablativer HSZT, entgegen der ursprünglichen Einteilung, auch noch nach Tag 100 auftreten kann, wird die Hypothese aufgestellt, dass LZ vom Empfänger nach nicht-myeloablativer Transplantation verglichen zu myeloablativen Regimen länger in der Haut persistieren.
8. Um diese These zu prüfen, wurde die Entwicklung und Kinetik des Chimärismus der LZ in der Haut nach nicht-myeloablativer Konditionierung im Hundemodell (n=9) mit einer Ganzkörperbestrahlung von 2 Gy, anschließender Immunsuppression mit Cyclosporin A in Kombination mit Everolimus und einer HSZT von einem DLA-identen Geschwistertier untersucht.
9. Hierfür wurde zunächst eine Methodik zur Isolierung caniner LZ aus der Haut etabliert.
10. Durch anschließende Messungen der erhaltenen Zellzahlen und der Reinheit der isolierten LZ sowie durch elektronenmikroskopische Darstellungen mit Nachweis der für LZ typischen Birbeck-Granula erwies sich die Isolierungsmethode als gut geeignet.

11. Die Bestimmung der LZ-Zahlen nach erfolgter nicht-myeloablativer HSZT ergab verglichen mit den publizierten Daten zu myeloablativen Konditionierungsregimen einen geringeren Zellzahlabfall sowie ein früheres Wiedererreichen der Ausgangszellzahl post transplantationem.
12. Die Analyse des Chimärismus der LZ zu definierten Zeitpunkten vor und nach durchgeführter HSZT erfolgte mit der Amplifikation von VNTR mit Hilfe der PCR, welche erstmalig erfolgreich an caninen LZ durchgeführt werden konnte.
13. Parallel erfolgte die Bestimmung des Chimärismus im Kompartiment Blut.
14. Verglichen mit den bisher publizierten Daten zur myeloablativen HSZT, zeigte sich ein verzögertes Auftreten von Spender-LZ in der Haut.
15. LZ des Empfängers konnten im Unterschied zu myeloablativen Therapieregimen auch noch nach über einem Jahr in der Haut nachgewiesen werden.
16. Die Chimärismusentwicklung in den LZ vom Empfänger zum Spender zeigte sich verglichen zu den peripheren Blutzellen signifikant verzögert.
17. Langzeitchimäre Tiere (\geq d +180 post transplantationem) entwickelten fortwährend auch einen steigenden Spenderanteil in den LZ.
18. Tiere mit einem 100% igen Spenderanteil im Blut entwickelten auch den höchsten Spenderanteil in den LZ, welcher jedoch in dem untersuchten Zeitraum bei keinem Tier 100% erreichte.
19. Hunde mit einer frühen Transplantatabstoßung (bis d +105 post transplantationem) entwickelten zu keiner Zeit einen Spenderanteil in den LZ.
20. Sobald sich einmal ein Spenderanteil in den LZ etabliert hatte, wies dieser auch dann einen fortwährenden Anstieg auf, obgleich es im Blut in der späten Post-Transplantationsphase zu einer Transplantatabstoßung bzw. zu einem abfallenden Spenderanteil kam. Diese Beobachtung stützt die These, dass sich LZ neben der Einwanderung aus dem Knochenmark in die Haut auch durch lokale Proliferation und somit unabhängig vom Knochenmark vervielfältigen können.

9. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Sabrina Peters, geb. Müller
Geburtsdatum:	02.03.1984
Geburtsort:	Berlin
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung:

1990 – 1994	19. Grundschule, Berlin-Hohenschönhausen
1994 - 2003	Coubertin-Gymnasium, 10407 Berlin
07/2003	Abschluss: Abitur

Hochschulstudium:

10/2003 bis 12/2009	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
08/2005	1. Staatsexamen
10/2009	2. Staatsexamen

Famulaturen:

2006	Abteilung für Innere Medizin in der Parkklinik Weißensee – Berlin
2007	Abteilung für Hämatologie/Onkologie am Universitätsklinikum Rostock
2007	Allgemeinmedizin in der Praxis Dr. med. M. Petermann / Dipl. med. A.-A. Groß
2008	Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum Südstadt Rostock

Praktisches Jahr

08/2008 - 10/2008	Anästhesie an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universität Rostock Prof. Dr. med. G. Nöldge-Schomburg
10/2008 - 12/2008	Intensivmedizin an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universität Rostock Prof. Dr. med. G. Nöldge-Schomburg
12/2008 - 02/2009	Nephrologie an der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock Dr. med. S. Mitzner

02/2009 - 03/2009	Kardiologie an der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock Prof. Dr. med. C. A. Nienaber
03/2009 - 07/2009	Allgemein- und Viszeralchirurgie an der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock Prof. Dr. med. E. Klar

Beruflicher Werdegang:

Seit 01/2010	Ärztin in Weiterbildung zur Fachärztin für Innere Medizin in der Medizinischen Klinik A, kardiologische Abteilung, der Ruppiner Kliniken (Prof. Dr. Dr. K. Schmailzl)
07/2010 – 12/2010	Assistenzärztin in der Abteilung für Pneumologie in der Medizinischen Klinik A der Ruppiner Kliniken Rotation im Rahmen der Facharztweiterbildung
04/2011 – 06/2011	Assistenzärztin in der Abteilung für Notfallmedizin in den Ruppiner Kliniken Rotation im Rahmen der Facharztweiterbildung
07/2011 – 06/2012	Assistenzärztin in der Abteilung für Intensivmedizin in der Medizinischen Klinik A der Ruppiner Kliniken Rotation im Rahmen der Facharztweiterbildung
07/2012 – 12/2012	Assistenzärztin in der Abteilung für Gastroenterologie in der Medizinischen Klinik B der Ruppiner Kliniken Rotation im Rahmen der Facharztweiterbildung

Publikationen:

- Poster:

3/2008	S. Mueller, S. Lange, S. Altmann, V. Weirich, H. Vogel, M. Freund, C. Junghanss. <i>Kinetics of Langerhans cell chimerism in the skin of dogs following 2 Gy TBI allogeneic hematopoietic stem cell transplantation</i> . 34 th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), Florence, Italy, 2008.
--------	---

- Artikel:

07/2012	C. Junghanss, S. Rathsack, R. Wacke, V. Weirich, H. Vogel, B. Drewelow, S. Mueller, S. Altmann, M. Freund, S. Lange. <i>Everolimus in combination with cyclosporin a as pre- and posttransplantation immunosuppressive therapy in nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation</i> . Biol. Blood Marrow Transplant. 18, 1061–1068 (2012).
---------	--

eingereicht 08/2013

S. Peters, C. Junghanss, A. Knueppel, M. Murua Escobar, C. Roolf,
G. Knuebel, A. Sekora, I. Lindner, L. Jonas, M. Freund, S. Lange.
*Kinetics of Langerhans cell chimerism in the skin of dogs following
2 Gy TBI allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.*
Eingereicht bei Transplantation 08/2013

Berlin, den 03.09.2013

Sabrina Peters

10. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Sabrina Peters, dass ich die vorliegende Promotion mit dem Titel „Entwicklung des Chimärismus der Langerhans-Zellen nach nicht-myeloablativer hämatopoetischer Knochenmarktransplantation im Hundemodell“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Berlin, den 03.09.2013

Sabrina Peters

11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Junghanß für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, seine stets freundliche Gesprächsbereitschaft und die hervorragende und intensive Betreuung dieser Arbeit bedanken. Auch möchte ich mich bei Dr. Sandra Lange für die ausgiebige fachliche und nicht zuletzt auch organisatorische Unterstützung sowie für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens herzlich bedanken.

Danken möchte ich zudem Prof. Dr. Ludwig Jonas für die Hilfe bei der Erstellung der elektronenmikroskopischen Bilder und dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Rostock und hier vor allem Dr. Iris Lindner und Diane Meißner für ihre Unterstützung bei der DNA-Isolierung aus den Langerhans-Zellen und der kapillarelektrophoretischen Messung meiner Proben.

Mein Dank gilt weiterhin dem gesamten Laborteam, welches zu jeder Zeit für eine angenehme und motivierende Arbeitsatmosphäre gesorgt hat. Vor allem möchte ich an dieser Stelle Anett Sekora für die Einarbeitung in die praktische Tätigkeit im Labor und Ihre tatkräftige Unterstützung bei der Umsetzung der Methodik von der Theorie in die Praxis danken. Weiterhin gilt ein großer Dank Gudrun Knübel für ihre geduldigen Erläuterungen zur PCR, ihr stets offenes Ohr und für die organisatorische Unterstützung bei der Umsetzung der Chimärismusanalyse in der Rechtsmedizin.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Christina und Bernd Müller, die mich in allen Lebenslagen unterstützt haben und mir nicht zuletzt mein Studium und auch diese Promotion ermöglicht haben. Bei meinem Mann, Christian Peters, bedanke ich mich dafür, dass er mich immer bestärkt hat, mein Promotionsverfahren schnellstmöglich durchzuführen und mir bei allen großen und kleinen Problemen geholfen hat. Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich bei meinem besten Freund Peter Breit für das mehrfache geduldige Korrekturlesen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meiner Schwester Ivonne Müller für ihre Liebe und Motivation bedanken. Sie hat, so lang es ihr möglich war, dafür gesorgt, dass ich neben der ganzen Arbeit nie vergessen habe, das Leben zu genießen, um wieder Kraft für neue schwierige Aufgaben zu tanken. Wir vermissen sie unendlich. Ihr widme ich diese Arbeit.